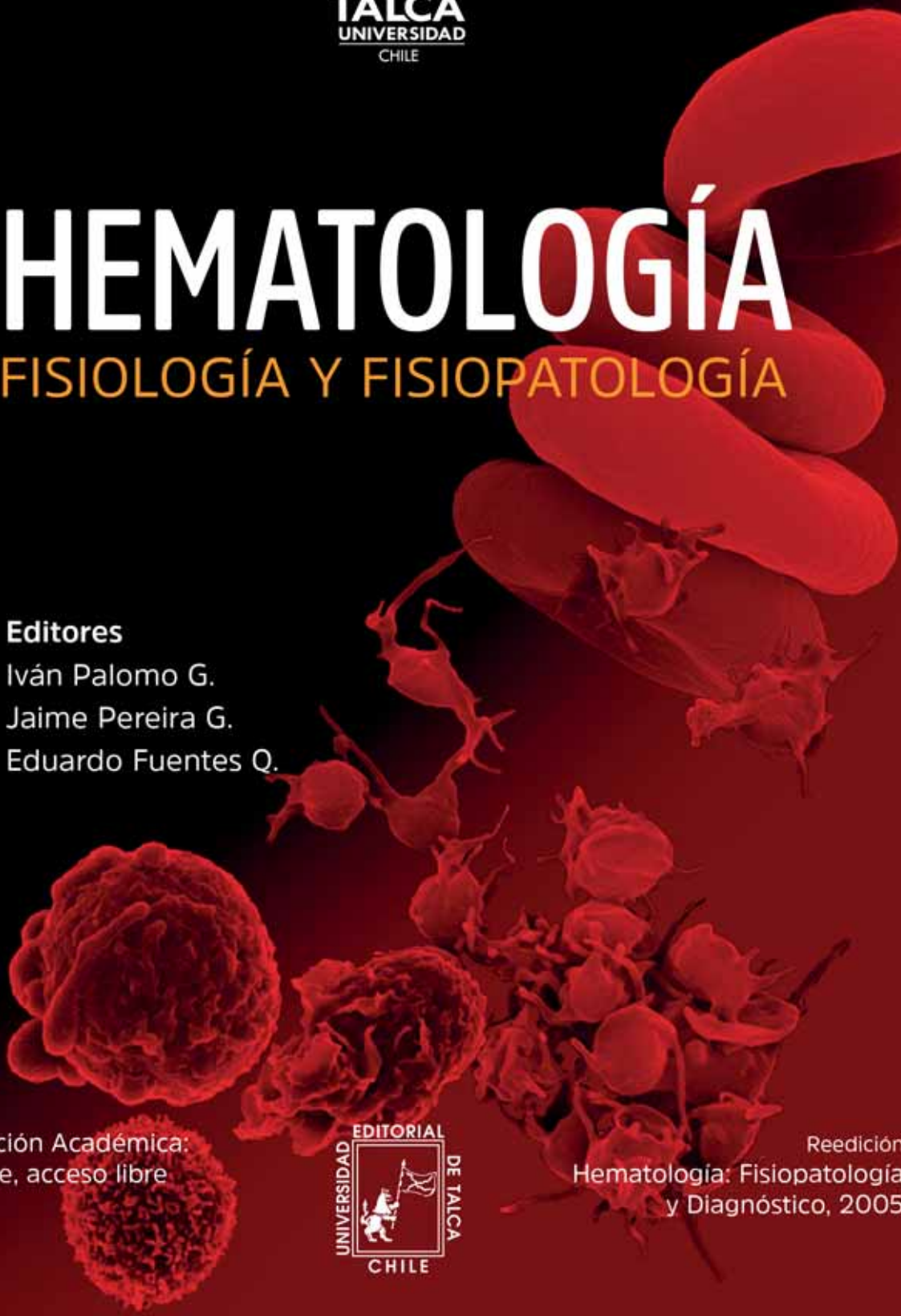
TALCA
UNIVERSIDAD
CHILE

HEMATOLOGÍA

FISIOLOGÍA Y FISIOPATOLOGÍA

Editores
Iván Palomo G.
Jaime Pereira G.
Eduardo Fuentes Q.



Colección Académica:
on-line, acceso libre

EDITORIAL
UNIVERSIDAD DE TALCA
CHILE

Reedición
Hematología: Fisiopatología
y Diagnóstico, 2005

eBook

La Editorial Universidad de Talca cuenta con Comité Editorial
y todos los libros son evaluados por pares externos calificados en el área.

COLECCIÓN ACADÉMICA
Serie de Textos Editorial Universidad de Talca

Primera edición 2005 (impresa)
Segunda edición 2009 (eBook)
Tercera edición actualizada 2022 (eBook)

Obra protegida por la ley N° 17.336 sobre Propiedad Intelectual

ISBN: 978-956-329-169-8

EDITORIAL UNIVERSIDAD DE TALCA

Talca - Chile, junio de 2022

Directora Editorial Universidad de Talca
Marcela Albornoz Dachelet

Editores
Iván Palomo G.
Jaime Pereira G.
Eduardo Fuentes Q.

Diseño Editorial
Carlos Osores O.

Corrección de textos
María Acevedo C.

Dibujantes de figuras:
Héctor Montecino G.
Marcelo Valenzuela V.

Todos los Derechos de fotografías y textos son reservados.
Su reproducción parcial o total podrá ser realizada solo
con la autorización de la Editorial de la Universidad de Talca.

HEMATOLOGÍA

FISIOLOGÍA Y FISIOPATOLOGÍA

Editores
Iván Palomo G.
Jaime Pereira G.
Eduardo Fuentes Q.

EDITORIAL
UNIVERSIDAD DE TALCA
CHILE

HEMATOLOGÍA

FISIOLOGÍA Y FISIOPATOLOGÍA

Editores
Iván Palomo G.
Jaime Pereira G.
Eduardo Fuentes Q.

TALCA
UNIVERSIDAD
CHILE

A nuestras familias y a los/as estudiantes

ÍNDICE

PREFACIO 17

PRÓLOGO 19

APARTADO 1. FISIOLOGÍA 21

▶ **Sección 1.1. Hematopoyesis** 22

Capítulo 1 23
Generalidades de la Hematopoyesis
Mauricio Sarmiento y Claudia Sáez

Capítulo 2 55
Eritropoyesis
María Elena Cabrera, Eduardo Retamales, Iván Palomo

Capítulo 3 62
Leucopoyesis
Marcelo Alarcón, Carolina Espinoza, Eduardo Fuentes, Ulises Vergara, Iván Palomo

Capítulo 4 71
Trombopoyesis
Andrés Trostchansky, Irene Wood, Diego Méndez, Héctor Montecino,
Eduardo Fuentes, Iván Palomo

▶ **Sección 1.2. Serie Roja** 83

Capítulo 5 84
Membrana de Glóbulos Rojos
Luis Guzmán, Eduardo Fuentes, Iván Palomo

Capítulo 6 101
Metabolismo no hierro de Glóbulos Rojos
Simón Navarrete, Eduardo Fuentes, Iván Palomo

Capítulo 7 110
Hemoglobina
Sergio Wehinger, Eduardo Fuentes, Iván Palomo

Capítulo 8 147
Metabolismo del hierro
Miguel Arredondo, Matías Rivera, Iván Palomo

Sección 1.3. Serie Blanca 167

Capítulo 9 168
Neutrófilos y Monocitos
Carolina Espinoza, Iván Palomo, Diego Méndez, Eduardo Fuentes y Marcelo Alarcón

Capítulo 10 189
Linfocitos
Ulises Vergara C, Iván Palomo

Capítulo 11 211
Eosinófilos y Basófilos
Sergio Wehinger, Eduardo Fuentes, Iván Palomo

Sección 1.4. Hemostasia 232

Capítulo 12 233
Hemostasia Primaria
Carina Pizzarossa, Cecilia Guillermo, Eduardo Fuentes e Iván Palomo

Capítulo 13 264
Sistema de la Coagulación
Simón Navarrete, Neftalí Guzmán, Eduardo Fuentes, Iván Palomo

Capítulo 14 298
Sistema Fibrinolítico
Neftalí Guzmán, Simón Navarrete, Eduardo Fuentes, Iván Palomo

APARTADO 2. FISIOPATOLOGÍA 313

Sección 2.1. Hematopoyesis 314

Capítulo 15 315
Aplasia medular
Pablo Sepúlveda y Marcela Córdova

Capítulo 16 345
Leucemias agudas
Lilian Pilleux

Capítulo 17 381
Síndromes Mielodisplásicos
Patricio Rojas, Iván Palomo

▶ **Sección 2.2. Serie Roja** 395

Capítulo 18 396
Síndrome Anémico
Pablo Sepúlveda, Iván Palomo

Capítulo 19 410
Anemia Ferropriva
Manuel Olivares, Iván Palomo

Capítulo 20 422
Anemias Megaloblásticas
José Díaz, Blaz Lesina, Iván Palomo

Capítulo 21 456
Anemia Sideroblástica
Dr. Rodrigo Boguen, Iván Palomo, Eduardo Fuentes

Capítulo 22 473
Anemia Secundaria a Enfermedades Crónicas
Blaz Lesina, Magdalena Sepúlveda, Eduardo Fuentes, Iván Palomo

Capítulo 23 485
Anemias Hemolíticas Intracorpusculares
Eduardo Retamales, José Díaz, Iván Palomo

Capítulo 24 568
Anemias Hemolíticas Extracorpusculares
Marcela Vásquez R, Mónica Maldonado, Iván Palomo

▶ **Sección 2.3. Serie Blanca** 612

Capítulo 25 613
Alteraciones cuantitativas de los Leucocitos
Marcelo Alarcón, Carolina Espinoza, Eduardo Fuentes, Iván Palomo

Capítulo 26 622
Leucemia Mieloide Crónica
María José García

Capítulo 27 632
Trombocitosis Esencial
Guillermo J. Ruiz-Argüelles, Guillermo J. Ruiz-Delgado, Guillermo Ruiz-Reyes

Capítulo 28 638
Policitemia Vera
Guillermo J. Ruiz-Argüelles, Guillermo J. Ruiz-Delgado, Guillermo Ruiz-Reyes

Capítulo 29 644
Mielofibrosis
Guillermo J. Ruiz-Argüelles, Guillermo J. Ruiz-Delgado, Guillermo Ruiz-Reyes

Capítulo 30 651
Leucemia Linfática Crónica
Vivianne Torres

Capítulo 31 671
Gammapatías Monoclonales
James Campbell Wagemann, Mauricio Ocqueteau Tacchini

Capítulo 32 693
Linfomas
Nicolás Triantafilo y Mauridio Ocqueteau

Sección 2.4. Hemostasia y Trombosis 724

Capítulo 33 725
Trombocitopenias
Pamela Zúñiga, Eduardo Fuentes, Diego Arauna, Iván Palomo

Capítulo 34 756
Trombocitopatías
Iván Palomo y Eduardo Fuentes

Capítulo 35 808
Enfermedad de Von Willebrand
Jaime Pereira e Iván Palomo

Capítulo 36 822
Hemofilias y otras Alteraciones Hereditarias de la Coagulación
Pablo Sepúlveda

Capítulo 37 845
Alteraciones Adquiridas de la Coagulación
Paola Turcatti, Natalia Neira, Cecilia Guillermo

Capítulo 38 874
Trombofilias
Jaime Pereira

AUTORES DE CAPÍTULOS

TM. Dr. Marcelo Alarcón L.
Profesor Asistente
Depto. de Bioquímica Clínica e Inmunohematología
Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad de Talca

TM. Dr. Diego Arauna F.
Centro de Investigación en Trombosis
Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad de Talca

TM. Dr. Miguel Arredondo O.
Profesor Titular
Unidad de Hematología
Instituto de Tecnología de los Alimentos
Universidad de Chile

TM. Dr. Rodrigo Boguen O.
Profesor Asistente
Departamento de Procesos Diagnósticos y Evaluación
Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad Católica de Temuco

Dra. María Elena Cabrera C.
Profesora Titular
Departamento de Medicina Interna Oriente
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

Dr. James Campbell W.
Instructor adjunto
Departamento de Hematología-Oncología
Escuela de Medicina
Pontificia Universidad Católica de Chile

Dra. Marcela Córdova A.
Hematóloga
Unidad de Hematología
Hospital Regional de Talca

TM. Dr. José Díaz G.
Profesor Asociado
Centro de Tecnologías para el Cáncer
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

TM. Mg. Carolina Espinoza R.
Conferenciante
Depto. de Bioquímica Clínica e Inmunohematología
Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad de Talca

TM. Dr. Eduardo Fuentes Q.
Profesor Asociado
Depto. de Bioquímica Clínica e Inmunohematología
Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad de Talca

Dra. María José García R.
Hematóloga
Departamento de Hematología-Oncología
Escuela de Medicina
Pontificia Universidad Católica de Chile

Dra. Cecilia Guillermo E.
Profesora Cátedra Hematología
Facultad de Medicina
Universidad de la República
Montevideo, Uruguay

TM. Dr. Luis Guzmán J.
Profesor Asistente
Depto. de Bioquímica Clínica e Inmunohematología
Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad de Talca

TM. Dr. Neftalí Guzmán O.
Profesor Asociado
Laboratorio de Investigación en Salud de Precisión
Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad Católica de Temuco

Dr. Blaz Lesina S.
Profesor Auxiliar
Unidad de Hematología del Instituto de Medicina
Facultad de Medicina
Universidad Austral de Chile

TM. Mg. Mónica Maldonado R.
Conferenciante
Depto. de Bioquímica Clínica e Inmunohematología
Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad de Talca

TM, Dr(c). Diego Méndez G.
Centro de Investigación en Trombosis
Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad de Talca

Ing. Dr(c). Héctor Montecino G.
Centro de Investigación en Trombosis
Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad de Talca

TM. Mg. Simón Navarrete P.
Conferenciante
Depto. de Bioquímica Clínica e Inmunohematología
Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad de Talca

Dra. Natalia Neira L.
Asistente
Departamento de Laboratorio Clínico
Hospital de Clínicas "Dr. Manuel Quintela"
Facultad de Medicina
Universidad de la República
Montevideo, Uruguay

Dr. Mauricio Ocqueteau T.
Profesor Asociado
Departamento de Hematología-Oncología
Escuela de Medicina
Pontificia Universidad Católica de Chile

Dr. Manuel Olivares G.
Profesor Titular
Universidad de Chile

TM. Dr. Iván Palomo G.
Profesor Titular
Depto. de Bioquímica Clínica e Inmunohematología
Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad de Talca

Dr. Jaime Pereira G.
Profesor Titular
Departamento de Hematología-Oncología
Escuela de Medicina
Pontificia Universidad Católica de Chile

Dra. Lilian Pilleux C.
Profesora Asociada
Unidad Hematología
Facultad de Medicina
Universidad Austral de Chile

Dra. Carina Pizzarossa Rodríguez
Médico Internista
Clínica Médica C, Facultad de Medicina
Universidad de la República, Uruguay

TM. Mg. Eduardo Retamales C.
Sección de Hematología y Banco de Sangre
Instituto de Salud Pública

BQ. Dr. Matías Rivera B.
Laboratorio Micronutrientes
Unidad de Nutrición Humana
INTA, Universidad de Chile

Dr. Patricio Rojas R.
Instructor adjunto
Departamento de Hematología-Oncología
Escuela de Medicina
Pontificia Universidad Católica de Chile

Dr. Guillermo Ruiz-Argüelles
Director General
Centro de Hematología y Medicina Interna de Puebla
Puebla, México

Dr. Guillermo J. Ruiz-Delgado
Director Médico
Centro de Hematología y Medicina Interna de Puebla
Puebla, México

Dr. Guillermo Ruiz-Reyes
Director emérito de Laboratorios Clínicos de Puebla
Puebla, México

BQ. Dra. Claudia Sáez S.
Profesora Asociada
Departamento de Hematología-Oncología
Escuela de Medicina
Pontificia Universidad Católica de Chile

Dr. Mauricio Sarmiento M.
Profesor Asistente
Departamento de Hematología-Oncología
Escuela de Medicina
Pontificia Universidad Católica de Chile

TM. Mg(c). Magdalena Sepúlveda E.
Centro de Investigación en Trombosis
Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad de Talca

Dr. Pablo Sepúlveda M.
Hematólogo
Unidad de Hematología
Hospital Regional de Talca

Dra. Vivianne Torres G.
Profesora Auxiliar
Instituto de Medicina
Facultad de Medicina
Universidad Austral de Chile

Dr. Nicolás Triantafilo C.
Hematólogo
Departamento de Hematología-Oncología
Escuela de Medicina
Pontificia Universidad Católica de Chile

BQ. Dr. Andrés Trostchansky V.
Profesor Asociado
Facultad de Medicina
Universidad de la República
Montevideo, Uruguay

Dra. Paola Turcatti C.
Profesora Adjunta
Departamento de Laboratorio Clínico
Facultad de Medicina
Universidad de la República
Montevideo, Uruguay

TM. Mg. Cs. Marcela Vásquez R.
Profesora Asistente
Depto. de Bioquímica Clínica e Inmunohematología
Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad de Talca

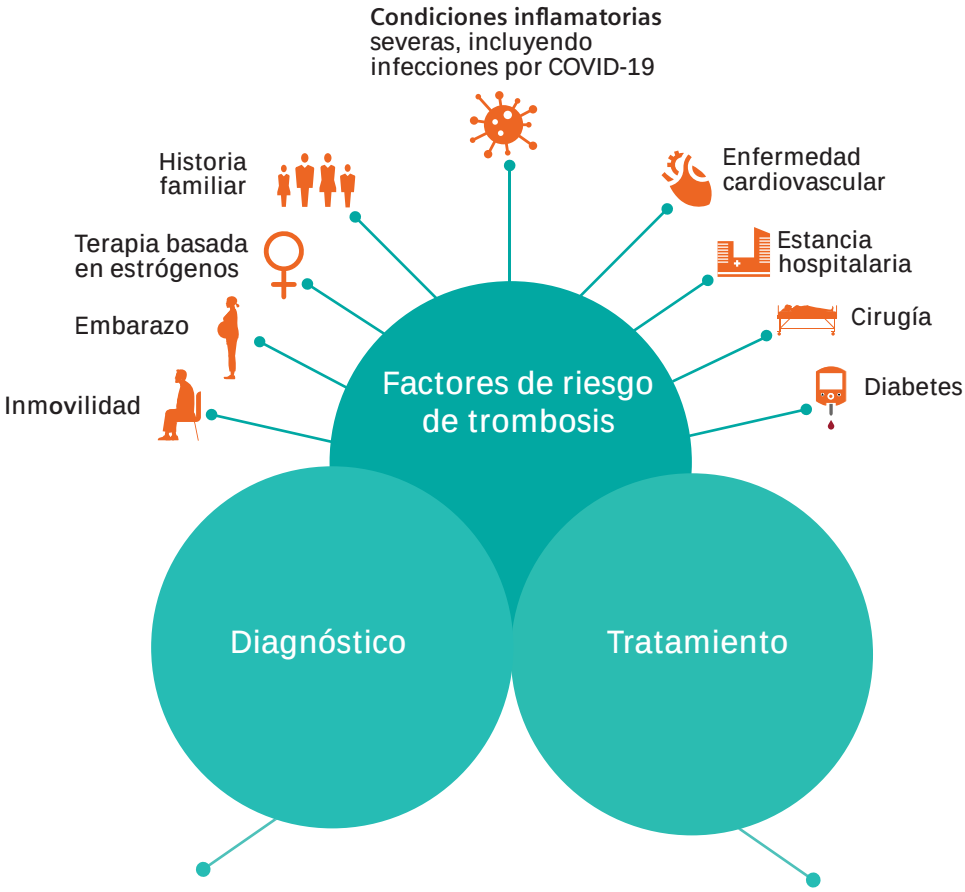
MV. Dr. Ulises Vergara C.
Profesor Titular
Departamento de Patología Animal
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias
Universidad de Chile

TM. Dr. Sergio Wehinger W.
Profesor Asociado
Depto. de Bioquímica Clínica e Inmunohematología
Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad de Talca

BQ. Dra. Irene Wood M.
Profesora Asistente
Facultad de Medicina
Universidad de la República, Uruguay

Dra. Pamela Zúñiga C.
Profesora Asociada
Departamento de Hematología-Oncología
Escuela de Medicina
Pontificia Universidad Católica de Chile

Soluciones de Hemostasia y Hematología para el correcto diagnóstico y seguimiento de tratamientos



LA1/LA2
Anticoagulante Lúpico

Berichrom Protein C
Deficiencia Proteína C

INNOVANCE D-Dimer
Dímeo D

ProC Ac R
Resistencia a la Proteína C Activada

INNOVANCE Antithrombin
Berichrom Antithrombin III (A)
Deficiencia de Antitrombina

INNOVANCE Free PS
Ag Protein S Ac
Deficiencia de Proteína S

INNOVANCE Anti-Xa
Heparina No Fraccionada
Heparina Bajo Peso Molecular
Apixaban
Ribaroxaban

Thromborel S
Innovin
TP TACO

Actin FS
Pathromtin SL
TTPA Heparina

Algunos exámenes de laboratorio para estudios de trombofilia y seguimiento de tratamiento

SIEMENS Healthineers

PREFACIO

El año 2005 editamos el libro docente “Hematología: Fisiopatología y Diagnóstico”. Dicho texto en su versión impresa se agotó rápidamente razón por la cual la Editorial de la Universidad de Talca lo dejó disponible gratis en el sitio web institucional. Alumnos/as de carreras que en su currículo incluyen hematología, de prácticamente todas las universidades del país han estudiado con él.

Dado que, al igual que otras ciencias biomédicas, la hematología ha presentado importantes avances, con el propósito de poner dicha información al alcance de los/las alumnos/as de pregrado, postgrado y profesionales, decidimos preparar una nueva edición del libro, ahora denominado “Hematología: Fisiología y Fisiopatología”. Este es un E-Book de acceso libre.

El libro cuenta con 38 capítulos, los que están organizados en dos apartados, fisiología y fisiopatología. Cada uno de los apartados cuenta con cuatro secciones: hematopoyesis, serie roja, serie blanca y hemostasia/trombosis.

Por tratarse de un texto docente y para facilitar su lectura, en los capítulos los subtítulos están numerados. Además, al inicio de cada capítulo se incluye un índice y un resumen, y al final las lecturas sugeridas.

Como autores de capítulos participan médicos, tecnólogos médicos y bioquímicos que trabajan en importantes instituciones del país y del extranjero. Salvo excepciones, los capítulos están escritos por dos o más autores.

Si bien el libro está escrito en castellano, se usarán algunos términos y siglas en inglés por lo difundido de su uso. A modo de ejemplo “DNA”, “RNA” y LT “helper”.

Agradecemos a las personas que colaboraron en la edición del libro, a la correctora de textos, Sra. María Acevedo, al diseñador gráfico Carlos Osores y a quien realizó las figuras del libro, Héctor Montecino G. Ingeniero en Bioinformática.

Damos las gracias a la Universidad de Talca, en las personas de su ex-Rector, Prof. Dr. Álvaro Rojas Marin, de su Rector, Prof. Dr. Carlos Torres Fuchslocher, y a la Editorial de la institución en la persona de su directora, Sra. Marcela Albornoz Dachelet, por el apoyo otorgado durante el desarrollo de esta obra.

Finalmente, expresamos nuestro deseo de que este libro sea de utilidad e interés para los/as alumnos/as y profesionales que deseen conocer sobre la fisiología y fisiopatología hematológica.

Dr. TM. Iván Palomo G.,
Dr. Jaime Pereira G. y
Dr. TM. Eduardo Fuentes Q.
Editores

PRÓLOGO

La Hematología es una especialidad que ha experimentado grandes avances en los últimos años, desde el conocimiento de las bases fisiológicas y fisiopatológicas. Destaca el gran aporte de los estudios de biología molecular que han permitido comprender mejor el desarrollo y evolución de estas patologías. Por otra parte, el nuevo conocimiento permite disponer de terapias cada vez más dirigidas a blancos específicos, como es el caso de los inhibidores de la tirosina kinasa que cambiaron la historia natural de la Leucemia Mieloide Crónica y el desarrollo de inmunoterapias (anticuerpos monoclonales y células CAR-T).

El conocimiento de la fisiología y la fisiopatología son fundamentales para comprender los mecanismos que llevan al desarrollo de las distintas patologías y de esta manera llegar a un adecuado diagnóstico y tratamiento. Este libro, cuya primera edición fue presentada en el año 2005, recoge las bases y los nuevos avances en la especialidad y los actualiza en esta nueva edición.

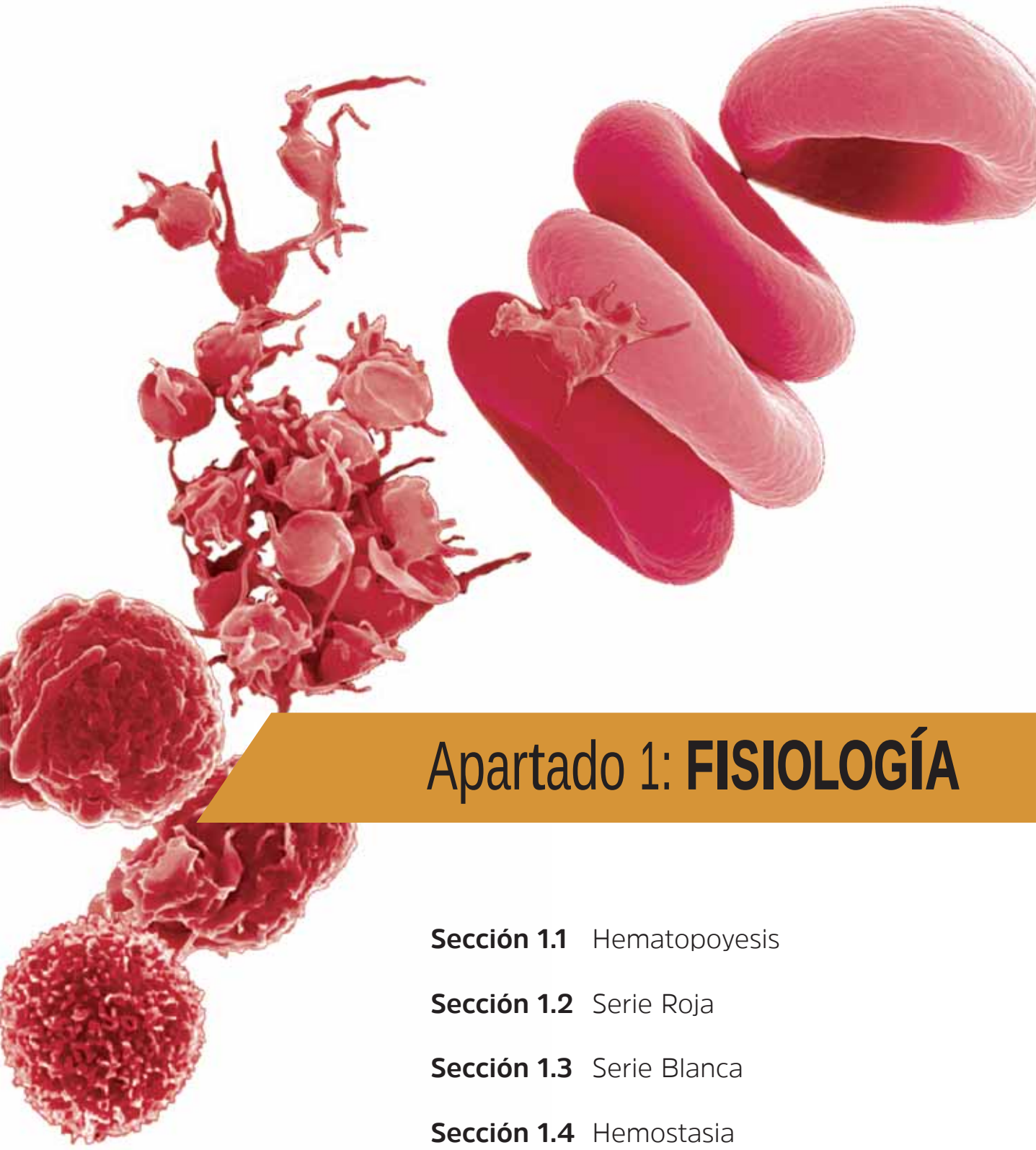
En sus primeros 14 capítulos, el libro recoge en forma ordenada la fisiología hematológica, incluyendo hematopoyesis y las tres series hematopoyéticas. Explora el glóbulo rojo desde su membrana, metabolismo y hemoglobina, el desarrollo de los distintos componentes de la serie blanca y la hemostasia, abarcando hemostasia primaria, secundaria y sistema fibrinolítico.

En los siguientes 24 capítulos se analiza la fisiopatología, comenzando con la hematopoyesis, donde se desarrolla la fisiopatología de la aplasia medular, leucemias agudas y síndromes mielodisplásicos. En la sección correspondiente a fisiopatología de la serie roja, se presenta el síndrome anémico, la anemia ferropriva, la anemia sideroblástica, de enfermedad crónica y las anemias hemolíticas por alteraciones intra y extracorpusculares. Luego en la sección de fisiopatología de la serie blanca, los temas analizados van desde las alteraciones cualitativas de los leucocitos a síndromes mieloproliferativos, leucemia linfática crónica y gammapatías monoclonales. Finaliza el libro con la sección Hemostasia y Trombosis donde se revisan las alteraciones cuantitativas y cualitativas de las plaquetas, Enfermedad de Von Willebrand, Hemofilia y otras alteraciones hereditarias de la coagulación como también adquiridas, finalizando con el capítulo de Trombofilias.

Luego de leer esta completa y actualizada revisión de la fisiología y fisiopatología hematológica, puedo concluir que estamos frente a un tremendo esfuerzo que nos proporciona un valioso material educativo. Sin duda será de gran utilidad, tanto para alumnos de pre como de postgrado de carreras de la salud. Quienes requieran comprender el funcionamiento normal de la hematopoyesis, las células hematológicas y la hemostasia, como también sus respectivas patologías, encontrarán en este libro una visión actualizada, ordenada y amena de las bases fisiológicas y fisiopatológicas de la hematología.

Creo un deber destacar el trabajo de este grupo de profesionales encabezados por sus editores, el Dr. Jaime Pereira G. de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile, el TM. Dr. Iván Palomo G. y el TM. Dr. Eduardo Fuentes Q., ambos de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Talca. Todos/as los autores/as de capítulos son docentes universitarios/as de destacada trayectoria, que han querido dejar este valioso material educativo a disposición de los/as estudiantes de la Salud. Estoy segura que el libro HEMATOLOGÍA, FISIOLOGÍA Y FISIOPATOLOGÍA será de gran ayuda en su formación en esta interesante y cambiante área de la medicina que, quienes hemos dedicado gran parte de nuestra vida profesional a ella, hemos visto cambiar y despejar muchas interrogantes lo que se traducirá en cada vez mejores tratamientos para nuestros pacientes.

Dra. María de los Ángeles Rodríguez Siclari
Past President Sociedad Chilena de Hematología



Apartado 1: **FISIOLOGÍA**

Sección 1.1 Hematopoyesis

Sección 1.2 Serie Roja

Sección 1.3 Serie Blanca

Sección 1.4 Hemostasia

SECCIÓN 1.1 **HEMATOPOYESIS**

Capítulo 1. Generalidades de la Hematopoyesis

Capítulo 2. Eritropoyesis

Capítulo 3. Leucopoyesis

Capítulo 4. Trombopoyesis

Capítulo

1

GENERALIDADES DE LA HEMATOPOYESIS

Mauricio Sarmiento M. y Claudia Sáez St.

Resumen

1. Introducción

2. Médula Ósea
2.1. Histología

3. Células Progenitoras Hematopoyéticas
3.1. Definición de Célula Progenitora Hematopoyética
3.2. Estudio de la Célula Troncal Hematopoyética
3.3. Identificación y Aislamiento de las Células Troncales Hematopoyéticas
3.4. Heterogeneidad de las Células Troncales Hematopoyéticas
3.5. División de las Células Troncales Hematopoyéticas
3.6. Ontogenia de la Célula Troncal Hematopoyética
3.7. Factores de Crecimiento involucrados en la decisión de linaje
3.8. Genes Involucrados en la decisión de linaje

4. **Microambiente de la Médula Ósea**

5. **Aspectos generales sobre maduración de diferentes linajes celulares**
   5.1. Eritropoyesis
   5.2. Granulomonopoyesis
   5.3. Linfopoyesis
   5.4. Megacariopoyesis

6. **Estudio de la Hematopoyesis**

7. **Lecturas sugeridas**

RESUMEN

Las células sanguíneas (glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas) se forman en la médula ósea a partir de células pluripotentes, a través de un proceso finamente regulado. Una característica distintiva del sistema hematopoyético es que las células maduras poseen una vida media corta, de modo que la hematopoyesis es, necesariamente, un proceso continuo durante la vida. Esta necesidad fisiológica es una de las más prioritarias en la homeostasis corporal puesto que células formes sanguíneas son esenciales y por ello, requieren renovación continua a través de la vida. En mamíferos, el sistema hematopoyético comprende una jerarquía de células en donde la célula progenitora hematopoyética o célula progenitora (Hematopoietic progenitor cells (HPCs) o hematopoietic stem cells (HSCs)) es la base. En un individuo adulto, la célula progenitora hematopoyética (CPHs) reside en la médula ósea y es responsable del desarrollo de todos los linajes de células sanguíneas maduras, reflejando su pluripotencialidad, su capacidad de diferenciación, de proliferación y de auto-renovación. Estudios destinados a entender cómo la célula troncal pluripotencial es capaz de auto-renovarse, de desarrollar la capacidad de restricción de linaje y de adquirir las características de una célula terminalmente diferenciada, han permitido identificar un gran número de factores y genes los que interactúan en forma controlada y coordinada con la finalidad de mantener el desarrollo normal de la hematopoyesis. La pluripotencialidad de las CPHs ha permitido tratar diversas enfermedades con trasplante hematopoyético. El microambiente en el cual las CPHs residen, otorga un entorno adecuado para el desarrollo de la hematopoyesis, proveyendo los factores y moléculas necesarias para la diferenciación, altamente regulada, maduración y eventual migración de las células a la circulación. Además de entender la regulación del sistema hematopoyético, el conocimiento de la biología de las CPHs es de crucial importancia médica, debido a su enorme potencial en reemplazos o reparación de tejidos y eventualmente como vehículo en terapias génicas. En este capítulo se revisan los aspectos más importantes de la CPHs y generalidades de la eritropoyesis, granulopoyesis, linfopoyesis y megacariopoyesis.

1. INTRODUCCIÓN

Las células sanguíneas (glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas) se originan en la médula ósea mediante un complejo proceso de diferenciación y maduración celular. En este proceso denominado hematopoyesis participan varios factores de maduración. También es fundamental la participación de las moléculas de adhesión celular, presentes en las células hematopoyéticas, en las células del estroma y en la matriz extracelular. Este capítulo describe los

aspectos fisiológicos fundamentales de la hematopoyesis y de cada una de las líneas celulares en particular.

2. MÉDULA ÓSEA

La hematopoyesis ocurre en la médula ósea a partir de la segunda mitad del embarazo y en el resto de la vida. Si bien los estudios realizados en modelo murino muestran que la hematopoyesis ocurre sobre todo en médula ósea de huesos largos, en los humanos adultos se da principalmente en el esqueleto axial, costillas, vértebras y hueso ilíaco.

La médula ósea se encuentra en la cavidad medular de los huesos largos (principalmente en las epífisis) y en los espacios existentes entre las trabéculas de los huesos esponjosos.

2.1. Histología

La médula ósea está formada por dos importantes compartimentos: vascular y hematopoyético (figura 1-1).

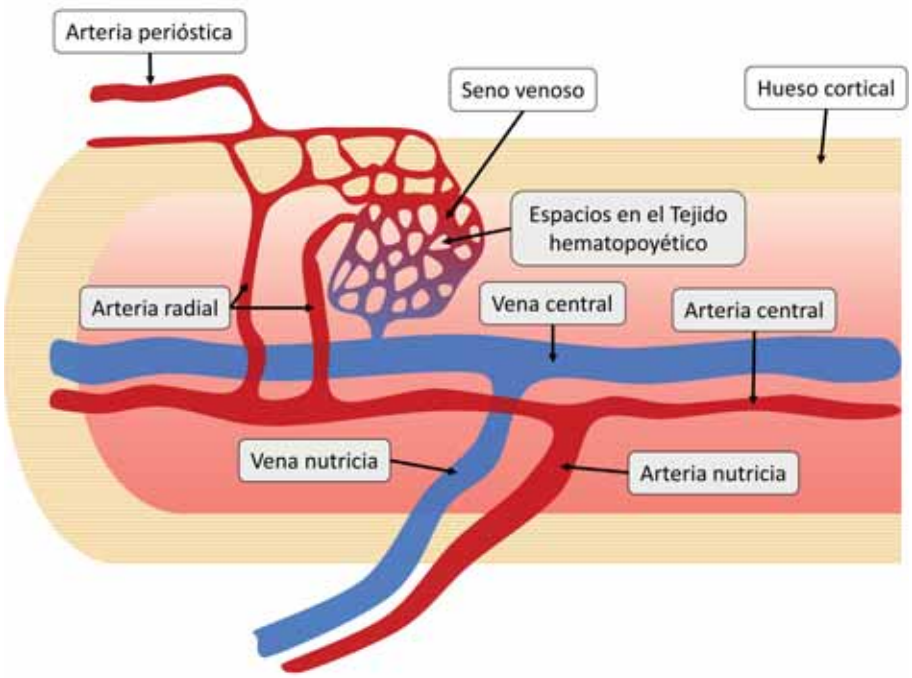


Figura 1-1. Estructura general de la médula ósea. Se destaca el compartimiento vascular (arterias, venas y sinusoides) y el compartimiento hematopoyético.

Los vasos sanguíneos del compartimiento vascular forman un esqueleto estructural en la médula ósea. La sangre que ingresa a la médula ósea lo hace por las arterias nutricias que perforan la diáfisis a través de los agujeros nutricios. Estas arterias entran en la cavidad medular y dan origen a la arteria lon-

gitudinal central, desde la cual se generan pequeños vasos que irrigan tanto la médula como el hueso cortical. Las ramas dirigidas a la médula descargan su sangre a capilares, los cuales vacían en una extensa red de sinusoides. Los sinusoides (45 a 80 mm de diámetro) están compuestos por una pared de células endoteliales, una lámina basal y una capa externa de células reticulares; estas últimas cubren aproximadamente el 50% de la superficie endotelial. Estos sinusoides drenan en una vena longitudinal central, que a su vez descarga su contenido en venas que salen del hueso por el conducto nutricio.

El pasaje transendotelial de células maduras, desde el comportamiento hematopoyético a la sangre, ocurre directamente a través de poros de migración transitorios (<4 µm de diámetro) que se forman en las células endoteliales de los sinusoides.

El compartimiento hematopoyético está formado por los islotes de células hematopoyéticas de las diferentes líneas celulares (serie eritroblástica, serie granulocítica, serie monocítica serie linfoide y serie megacariocítica), en sus distintos estadios madurativos. Las células se ubican entre los sinusoides, y entre estos y la cortical del hueso. Además de las CPHs en la médula ósea también existen otras células que forman parte del denominado estroma medular. Entre ellas destacan: macrófagos, células reticulares y algunas células adiposas (figura 1-2). Estas células participan activamente en la regulación de la hematopoyesis secretando citoquinas y factores de maduración. Adicionalmente, los macrófagos fagocitan núcleos expulsados por los eritroblastos ortocromáticos al madurar a reticulocitos, células alteradas y células muertas.

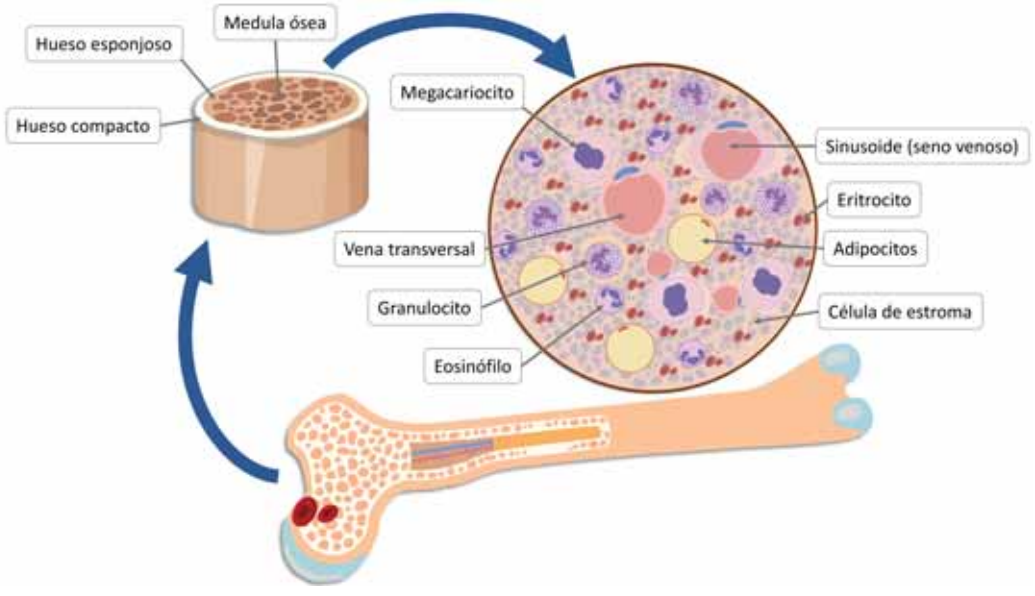


Figura 1-2. Estructura histológica de la médula ósea. La médula ósea está formada por vasos sanguíneos, sinusoides, células del estroma y células hematopoyéticas. Los distintos tipos de células se desarrollan en islotes hematopoyéticos ubicados a diferente distancia de la pared de los sinusoides, según el linaje celular.

a) Compartimiento de células madre

Las CPHs representan menos del 1% de las células de la médula ósea. No son identificables morfológicamente, por lo que deben ser identificadas por el inmunofenotipo (CD34+, CD38-) y adicionalmente (CD90+, CD117+ y HLA-DR-), o ser estudiadas en cultivos *in vitro* (ver más adelante). Las CPHs también denominadas CFU-ML (Unidad formadora de colonias mieloides y linfoides) dan origen a dos líneas celulares principales, mieloide y linfoide (figura 1-3). En la línea mieloide, a partir de la CFUGEMM (granulocítica, eritroide, monocítica y megacariocítica) se producen dos diferentes CFU "encomendadas", CFU-GM (granulocito, monocito) y CFU-MegE (megacariocito, eritroide); posteriormente se generan las CFUG, CFU-M, CFU-E, CFU-Meg.

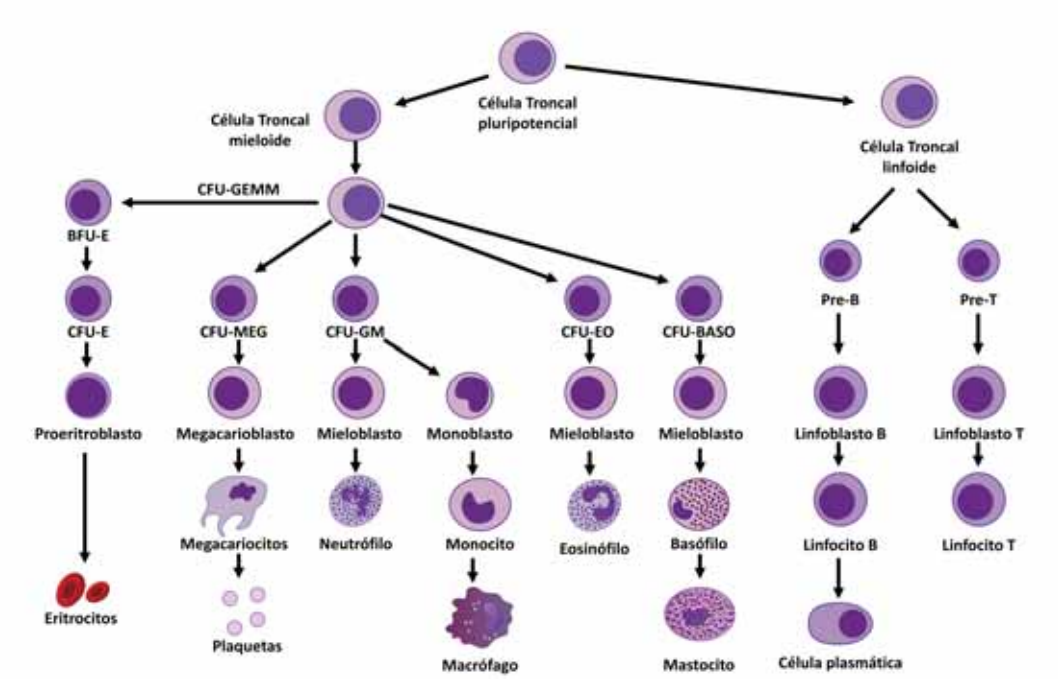


Figura 1-3. Esquema de la Hematopoyesis. La célula madre pluripotencial autoperpetuable, da origen a una célula pluripotencial, también denominada CFU-ML (Unidad formadora de colonias mieloides y linfoides), de la que se originan: a) el progenitor mieloide (CFU-GEMM), a partir del cual por procesos de maduración y diferenciación se originan los granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos), monocitos, eritrocitos y plaquetas; y b) el progenitor linfoide (CFU-L), que después de un proceso de maduración y diferenciación, da origen a los linfocitos T y linfocitos B. Se muestra los puntos de acción de las citoquinas (IL-1, IL-3, IL-6 e IL-7) y factores estimuladores de colonias (CSF) específicos, que participan como factores reguladores de la granulopoyesis y linfopoyesis. EPO, eritropoyetina; TPO, trombopoyetina.

Entre los mecanismos de control que regulan las células troncales, destacan: células del estroma medular, matriz extracelular (fibronectina, vitronectina, laminina, colágeno), moléculas de adhesión (integrinas, superfamilia de las inmunoglobulinas, selectinas), y citoquinas y factores de crecimiento.

Cuando se lleva este proceso a la aplicación clínica, se pueden obtener CPH. Actualmente existen varias fuentes de «stem cells»: médula ósea, sangre periférica, sangre de cordón umbilical, hígado fetal y sistemas in vitro, siendo la sangre periférica y de cordón umbilical las más utilizadas actualmente en el tratamiento con células progenitoras.

b) Compartimiento mitótico
A partir de las CFU de las líneas celulares específicas antes mencionadas, se generan las primeras células reconocibles morfológicamente de cada línea celular: mieloblasto en el caso de los granulocitos, que posteriormente madurará a promielocito y luego a mielocito etapa en la cual se diferencian las tres líneas específicas de los granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos).

c) Comportamiento de maduración - almacenamiento
Las etapas posteriores de maduración de los granulocitos corresponden a juveniles, baciliformes y segmentados. Por su parte, la serie monocítica madura en las etapas de monoblasto y monocito. De la CFU-Meg, la línea megacariocítica se reconocen las etapas de megacarioblasto, megacariocito y plaquetas. En la serie eritroblástica se reconocen las etapas, proeritroblasto, eritroblasto basófilo, eritroblasto policomatófilo, eritroblasto ortocromático, reticulocito y glóbulo rojo. En la línea linfoide, a partir de la CFU-L, después de un proceso de diferenciación y maduración se originan los linfocitos B y linfocitos T; estos últimos requieren una etapa posterior de maduración en el Timo.

3. CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS

3.1. Definición de célula progenitora hematopoyética

Décadas de estudios funcionales realizados en ratones y últimamente en humanos, han contribuido a la definición conceptual de la CPHs como una población celular que reside en la médula ósea de un individuo adulto y que es responsable del origen de todo el espectro de células sanguíneas maduras. Tres propiedades características de la CPHs son, su multi-potencialidad, su capacidad de autorenovación y de proliferación. Por lo tanto, una célula troncal hematopoyética puede ser definida como células clonogénicas que poseen la propiedad de renovarse a sí mismas, de proliferar y de diferenciarse hacia todos los tipos de células sanguíneas.

3.2. Estudio de la célula troncal hematopoyética

Con el propósito de comprender la biología de las CPHs, se han desarrollado diversos ensayos tanto *in vivo* como *in vitro*. La mayoría de estos sistemas permiten estudiar la potencialidad de las CPHs para diferenciarse a células sanguíneas maduras o a sus precursores. En general, los ensayos *in vitro* miden la actividad de células más maduras, y los *in vivo*, generalmente detectan la actividad de células más primitivas, siendo necesario el trasplante o injerto de las células a un ambiente adecuado para producir la progenie.

Ensayos *in vitro*

Los sistemas de cultivo *in vitro* se pueden agrupar en dos categorías generales: los independientes de estroma y los dependientes de estroma:

a) Cultivo *in vitro* independiente de estroma. Entre los cultivos de este tipo está el ensayo de unidades de formación de colonias en cultivo (CFU-C) el cual detecta el crecimiento de células hacia una población más madura, comprometida al linaje eritroide o mieloide. Las colonias emergen luego de 5 a 14 días de cultivo en un medio semi-sólido, en presencia de uno o más factores de crecimiento. Una célula primitiva que posea potencialidad de multilinaje y un alto grado proliferativo en cultivo, es denominada una "célula formadora de colonias de alto potencial proliferativo" ("high proliferative potencial colony-forming cell": HPP-CFC). En este caso, es posible observar colonias que se caracterizan por alcanzar un tamaño mayor a 0,5 mm de diámetro y por contener varias células de la línea mieloide.
b) Cultivo *in vitro* dependiente de estroma. Un ensayo que se correlaciona mejor con la actividad de las CPHs, es el cultivo dependiente de estroma por largos períodos de tiempo o "long-term culture initiating cell" (LTC-IC). Las células primitivas, cultivadas sobre una capa de células estromales generan progenie aproximadamente a las 12 semanas de cultivo, teniendo la precaución de remover células semanalmente para evitar su sobrecrecimiento. Esta alta capacidad de crecimiento es indicativa de la habilidad de auto-renovación continua que poseen las células primitivas.

En la actualidad es sabido que menos del 0.1% de las CPHs de la médula ósea retienen la capacidad de proliferar por periodos largos. Un porcentaje equivalente posee la capacidad de auto-renovarse

Ensayos *in vivo*

Uno de los ensayos utilizados experimentalmente, ha sido el de formación de unidades de colonias en bazo o "colony-forming unit-spleen assay (CFU-S), desarrollado en 1961 por Till y McCulloch, el cual se basa en el trasplante de células de médula ósea o de bazo en ratones irradiados letalmente. Luego de 8 ó 12 días, los bazos de estos ratones se analizan para la detección de colonias, llamadas CFU-S8 y CFUS12, respectivamente. Estas colonias representan dos poblaciones diferentes de células, las que generaron las CFU-S8 son predominantemente uni-potenciales y están compuestas primordialmente de células del linaje eritroide y las CFU-S12 están compuestas por varios tipos de células mieloides, incluyendo eritrocitos, megacariocitos, macrófagos y granulocitos.

Un ensayo más riguroso para evaluar actividad de CPHs es el ensayo de repoblación por largos períodos de tiempo o "long term repopulation assay" (LTRA), ya que requiere que las células a analizar posean los criterios que definen una CPHs. Las células donantes son multipotenciales si generan células

del linaje linfoide (B y T) además del mieloide; poseen capacidad de auto-renovación si son capaces de mantener su actividad por periodos de tiempo prolongados y además, poseen la habilidad de proliferar. En este ensayo, las células troncales se trasplantan en ratones que han sido irradiados letalmente para depletar las células hematopoyéticas endógenas y se evalúan a las 8 a 10 semanas post-trasplante. Luego de este periodo se espera que haya ocurrido un reestablecimiento de la hematopoyesis con células provenientes de las CPHs trasplantadas. La incorporación de marcadores celulares en las CPHs donantes comprueba que las células hematopoyéticas generadas en el ratón receptor son efectivamente progenie de las células trasplantadas. El ensayo de re-trasplante de las CPHs en un segundo animal puede ilustrar y cuantificar el proceso de auto-renovación, propiedad de CPHs verdaderas.

3.3. Identificación y aislamiento de las células troncales hematopoyéticas.

Una de las primeras aproximaciones utilizadas para aislar CPHs de médula ósea se basó en técnicas de separación por densidad y tamaño. Ensayos de velocidad de sedimentación y centrifugación por gradientes de equilibrio demostraron que las células de CFU-S proliferantes poseen un tamaño que varía entre 7,3 a 9,2 µm de diámetro, en tanto que las células no proliferantes no superan 7,0 µm de diámetro. Enriquecer la obtención de CPHs es requisito para su estudio e identificación. Una de las estrategias empleadas utilizó drogas que intervienen en el ciclo celular (vinblastina, 5-Fluorouracil, etc.) que depletan las células proliferantes de la médula ósea y enriquecen la población de células no proliferantes. A pesar de que esta estrategia enriquece la población de CPHs y la actividad de CFU-S, la calidad de las células se ve afectada. Un avance importante para la separación de CPHs se logró mediante la utilización de la citometría de flujo o "fluorescence-activated cell sorter" (FACS). Este método utiliza un flujo citométrico que separa células en base a sus características físicas tales como tamaño o granularidad y además, por la presencia de marcadores de superficie celular. Anticuerpos específicos, marcados con moléculas fluorescentes, diseñados a reconocer proteínas de la superficie celular generan un patrón de fluorescencia por la incidencia de un rayo láser, permitiendo su identificación y subsiguiente separación. Para la utilización de esta técnica fue necesario la identificación de proteínas que fueran expresadas específicamente en la superficie de la CPHs. En 1982, Muller-Sieburg y colaboradores desarrollaron una estrategia para la separación de CPHs de ratón por FACS basados en un protocolo de selección negativa, en el cual utilizaron una mezcla de antígenos expresados en células B y T maduras, macrófagos y granulocitos. Combinando esta estrategia y la selección de células negativas para el antígeno de linaje ("Lin neg") y con baja expresión de Thy-1 ("Thy-1low"), se obtuvieron CFU-S enriquecidas 200 veces. Estos estudios dieron el impulso necesario para optimizar la técnica de separación y reconocimiento, basado en el uso de ratones con genes apagados, insertados o super expresados, que hacen una expresión incrementada de la célula de interés. En la actualidad, en modelo murino hay diversas cepas que permiten análisis detallado de CPHs en base a fenotipos como se muestra en tabla 1-1.

Tabla 1-1. Ratones transgénicos para marcado y separación de CPHs

Cepa de ratón	modificación genética	Especificidad en el compartimento adulto hematopoyético	Análisis realizados
HoxB5-TrimCherry Hox4B-YFP	"Knock in"	CPHs de larga vida	CUBIC modificado CMF Trasplante
Ctnnal1-GFP	"Knock in"	CPHs, precisa enriquecimiento célular por KIT	microscopía multifotón CMF Trasplante Modificación de clearance de Murray
Fdg5-mCherry	"Knock in"	marcaje de precursor mieloide y megacariocítico	CMF Trasplante Inmunohistoquímica con microscopía confocal
Msi2-GFP	"Knock in"	Enriquece CPHs de alta pureza	Trasplante CMF
Pdzklip1-GFP	Transgénico	Enriquece CPHs de alta pureza	Doxycicline chase Trasplante CMF
Evi1-GFP	"Knock in"	Marcaje de CPHs	Trasplante CMF
Scl-tTa-H2B-GFP Tie-GFP Gpr5C-GFP Hdc-GFP	Transgénico	Enriquece CHPs quiescentes de larga duración	Doxycicline chase Trasplante CMF Inmunohistoquímica con microscopia confocal
Gata2-GFP	"Knock in"	Marcaje de CPHs	CMF

Detección de CPHs

Las CPHs humanas se aíslan comúnmente en base a los marcadores de superficie CD34, CD38- HLA-DR-, bajos niveles de Thy-1 y la ausencia del marcador de linaje Lin. Estas células poseen la capacidad de multilinaje en ensayos *in vivo* e *in vitro* (LTC-IC) y son capaces de mantener su propiedad de auto-renovación en ensayos de repoblación celular en un segundo huésped. Funcionalmente, CD34 es importante en la adhesión de las células hematopoyéticas al estroma de la médula ósea y en la interacción entre los progenitores. En general, las CPHs tempranas expresan altos niveles de CD34 que va disminuyendo conforme a la maduración de la célula hasta desaparecer al alcanzar el grado de diferenciación del linaje determinado. Este marcador es relevante en trasplantes autólogos y alogénicos.

El antígeno c-kit (CD117) es miembro de la familia de los receptores de tirosinas kinasas y tiene capacidad de una vez unido a su ligando ("stem cell factor" o factor de células madre) provocar cambios en el receptor tipo tirosina quinasa, enzima que cataboliza la formación de tirosina y lo cual finalmente desencadena fosforilación de numerosas proteínas que promueven crecimiento y regulan negativamente proteínas apoptóticas. Se puede detectar por citometría de flujo con el antígeno CD117 y se puede encontrar en células madre normales, pero también en células cancerosas como leucemias y tumores estromales digestivos.

CD38 también se ha considerado un marcador a considerar en relación a CPHs. CD38 es una glicoproteína de tipo II que se describió originalmente como un marcador de diferenciación de la superficie de las células linfoides. Con frecuencia, en la actualidad, el inmunofenotipo CD34 + / CD38− se usa para identificar CPHs como células iniciadoras de leucemia en Leucemia mieloide aguda.

Otro marcador de CPHs es CD133 (AC133) y está asociado con la mantención de los estados primitivos de diferenciación. Sin embargo, la importancia de este marcador está dada solo como complemento a otros marcadores debido a que no se ha comprobado su eficacia específica para el aislamiento o expansión de las CPHs.

3.4. Heterogeneidad de las células troncales hematopoyéticas

Las técnicas de aislamiento de CPHs actuales no han permitido aún la obtención de células de suficiente pureza de modo que cada una de ellas sea capaz de repoblar el sistema hematopoyético de un ratón. Debido a esto, se ha incorporado el concepto de un compartimiento de células troncales que contiene CPHs y, además, una población de células multipotentes que pueden carecer de la propiedad de auto-renovación en forma permanente o continua. Utilizando un colorante fluorescente mitocondrial, rodamina-123 (Rho-123), se han identificado CPHs con diferentes grados de fluorescencia que corresponden a células con distintas actividades de auto-renovación en ensayos *in vivo* e *in vitro*, pero capaces de mantener un cierto grado de multilinaje. Como hemos mencionado anteriormente, las CPHs que mantienen una extensa capacidad de regeneración constituyen,

probablemente, menos de un 0,01% de las células de la médula ósea, con una frecuencia de aproximadamente 1 CPHs por 10.000 células de la médula. La capacidad proliferante permitiría que la CPHs cumpla con la extraordinaria función de producir células sanguíneas durante toda la vida de un individuo. En trasplantes de médula ósea, para propósitos terapéuticos, es preciso determinar lo que constituye una CPHs verdadera, sin embargo, ha demostrado ser más útil funcionalmente, considerar la célula troncal como aquella que es capaz de renovarse a sí misma y de diferenciarse en células hematopoyéticas maduras independiente de su grado de pureza. Este concepto de compartimiento de células troncales involucra una jerarquía de CTHs con capacidad de auto-renovación y de multilinaje.

3.5. División de las células troncales hematopoyéticas

La generación continua de células sanguíneas maduras desde el "pool" de células troncales multipotentes, sin alteración del tamaño de este, puede lograrse por división celular simétrica, asimétrica, o ambas, en cualquier nivel de la jerarquía hematopoyética. Una de las preguntas es cómo logra la CPHs dividirse produciendo dos células hijas con diferentes destinos, y si es así, cómo regula esta asimetría. La asimetría puede resultar por procesos extrínsecos o intrínsecos. Los factores de envejecimiento comúnmente reconocidos, como los agregados de proteínas, los orgánulos de disfunción y el daño del ADN, se segregan asimétricamente entre dos células durante la división (figura 1-4). En el modelo extrínseco, las células hijas son originalmente idénticas, pero adoptan diferentes destinos debido a factores ambientales como, por ejemplo, citoquinas. En el modelo intrínseco, la célula hija difiere al momento de la división debido a una partición desigual de los determinantes del destino celular, tales como factores de transcripción, receptores celulares o RNA.

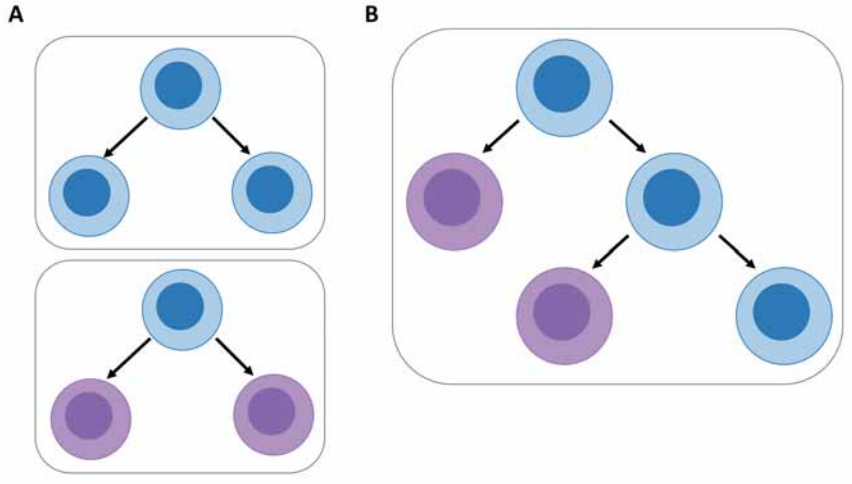


Figura 1-4. Modelos de división simétrica versus asimétrica en células troncales hematopoyéticas. División celular simétrica (A), la cual puede dar como resultado dos células troncales hijas (gris) o dos progenitores de linaje restringido (blanco). En este modelo, la célula progenitora debe poseer la capacidad de auto-renovación para permitir la expansión de un linaje determinado (B) Modelo en que todas las divisiones son asimétricas; este modelo no permite un aumento del tamaño del "pool" de células troncales.

Estudios en diferentes modelos sugieren que la mayoría de las células madre pueden alternar entre divisiones simétricas y asimétricas, y el equilibrio entre la decisión de una división y otra estaría controlado por señales internas y externas destinados a resguardar la producción de un número apropiado de células madre y diferenciadas.

La búsqueda de mecanismos moleculares que expliquen la división celular asimétrica ha llevado a la identificación de los genes "notch" como cruciales en la regulación de la autorenovación celular versus diferenciación celular. El producto proteico del gen "notch" funciona como receptor de superficie celular y además como factor de regulación de la transcripción, con la función de transmitir señales del medio ambiente hacia el núcleo de la célula. La activación de "notch" inhibe la diferenciación celular y variaciones en los niveles de expresión del mismo dan como resultado una heterogeneidad de respuesta a la diferenciación celular. En mamíferos, se han identificado cuatro genes homólogos a "notch" (notch 1-4) y en vertebrados su expresión se ha observado en tejido neuro-epitelial, epidermis, epitelio intestinal y dentario, endotelio, precursores hematopoyéticos y estroma. La participación de "notch" en hematopoyesis ha sido ampliamente investigada desde su detección en células CD34+ de médula ósea y en células hematopoyéticas precursoras. De hecho, algunas leucemias linfoblásticas T involucran una mutación en el gen "notch"-1 resultando en una activación constitutiva de la proteína lo que contribuiría a la enfermedad. Estudios recientes han demostrado que las señales a través de "notch" pueden inhibir apoptosis, lo que sugiere la posibilidad de que una alteración de la actividad proteica de "notch" pueda contribuir a la leucemia por inhibición de muerte celular, además o en vez del aumento de proliferación celular. Las señales de "notch" pueden ser reguladas a diferentes niveles y un sinnúmero de evidencias experimentales involucran a los productos proteicos de los diferentes genes "notch" en diversas respuestas, no solamente en la capacidad de auto-renovación celular sino además en la decisión de linajes de diferenciación hematopoyética, lo cual dependería de la señal extracelular o ligandos tales como citoquinas o factores de crecimiento.

Recientemente se ha establecido que hay por lo menos 4 formas de cinética de subdivisión hematopoyética. De forma clásica se han descrito la división del linaje de CPHs mieloide (MyBi HSC), la división del linaje de CPHs linfoide (Ly-Bi CPHS) y una tercera forma más asociada a la cinética balanceada de producción (Bala CPHs). La aparición de una de reconstitución celular en el modelo murino y clínico de trasplante en el que se observa un orden jerárquico de la función hematopoyética en que se observa una toma de injerto en primer lugar granulocítico, seguida por la megacariocítica y eritroide y finalmente seguida varios meses después de la recuperación linfoide. Esta última se observa en el proceso del trasplante, no reflejando necesariamente la cinética "natural" sino más bien la reconstitución luego de enfermedades graves medulares.

3.6. Ontogenia de la célula troncal hematopoyética

Desde el desarrollo de un animal, el cual comienza con la fertilización del ovocito, las células se comprometen, progresivamente, a un tipo celular específico. Las células generadas a partir de las primeras divisiones celulares post fertilización tienen la capacidad de formar un animal completo, por lo que se les denomina "totipotentes". En mamíferos, esta capacidad se pierde durante el pre-implante, en la formación de la blástula en la que se distinguen una capa externa, una capa interna y una masa celular interna de la cual se pueden obtener células troncales embriónicas pluripotentes (ES). Durante la gastrulación se establecen las tres capas germinales, el ecto-, endo- y mesodermo con el consecuente grado de compromiso celular, lo que dará como resultado células maduras con funciones específicas con una vida media limitada y baja capacidad de proliferación, necesitando ser renovadas constantemente. Sin embargo, no todas las células maduran a etapas terminales y es posible encontrar células en tejidos diferenciados con capacidad proliferativa y de auto-renovación, las que se denominan células multipotentes (figura 1-5).

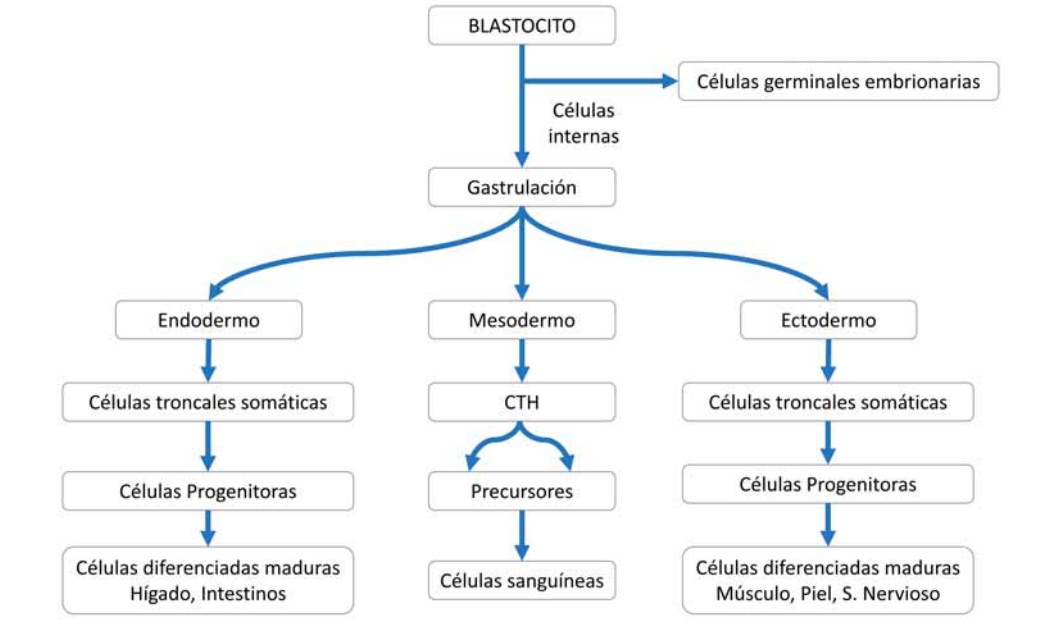


Figura 1-5. Ontogenia de la célula troncal. Células pluripotentes provenientes del endodermo, mesodermo o ectodermo, formados durante la embriogénesis, evolucionan a tejidos específicos, células terminalmente diferenciadas y células troncales multipotentes.

Células hematopoyéticas (CH) y células endoteliales vasculares (CE) son los tejidos que maduran más tempranamente durante embriogénesis y es ampliamente aceptado que ambos tipos celulares comparten precursores comunes. Durante la embriogénesis temprana, estos linajes se forman desde el mesodermo próximo-lateral y evidencias histológicas sugieren que tanto las CH como las CE se diferencian desde un precursor bi-potente llamado heman-

gioblasto. Inmediatamente luego de la generación del mesodermo, las células de la región interna se diferencian a CH y las de la región externa a CE vasculares. Estudios inmuno-histológicos han demostrado la expresión de marcadores de células endoteliales tales como CD31 y cadherina (Cadherina-EV) en las células de la capa externa y la ausencia de estos en las células de la región interna. Ambos tipos celulares expresan CD34 observándose la aparición de marcadores específicos para CE y para CH a medida que el proceso de diferenciación ocurre. En varias especies de vertebrados se ha observado que el sitio primario de hematopoyesis es el mesodermo del saco embrionario. Las señales moleculares necesarias para la generación del sistema hematopoyético en el embrión y en adulto involucran a genes tales como bmp-4 que actúa tempranamente afectando la formación del mesodermo, al gen para el receptor de tirosina kinasa, flk-1, al gen para el factor de crecimiento transformante, tgfβ1 y al gen para el factor de crecimiento "Stem Cell Leukemia", scl. Un gran número de genes parecen participar en la regulación del desarrollo de la hematopoyesis a diferentes niveles, ya sea a nivel embriogénico o en la hematopoyesis definitiva. Sin embargo, las evidencias sugieren que la hematopoyesis primitiva embrionaria no requiere de CPHs definitivas, en tanto que para la hematopoyesis adulta su existencia es crucial. El funcionamiento de la jerarquía hematopoyética adulta requiere de señales adicionales de regulación que confieran otras propiedades, tales como un alto grado de proliferación celular, capacidad de autorenovación y señales relacionadas con la integración de las células a otros tejidos.

3.7. Factores de crecimiento involucrados en la decisión de linaje

La sobrevida y proliferación de la CPHs y de progenitores más diferenciados está ampliamente influenciada por la acción de diferentes tipos de mediadores, tales como citoquinas, factores de crecimiento, péptidos, moléculas de adhesión y la expresión de sus respectivos receptores. Estos cumplen un rol importante en la especificación de linaje y en la determinación del destino de las células precursoras. En general, tres modelos podrían explicar la acción de factores extrínsecos sobre el destino de células precursoras (figura 1-6). Es posible que células funcionalmente equivalentes, las cuales poseen al menos dos potenciales de linaje, reciban diferentes señales externas y respondan de acuerdo al linaje especificado por la señal. Otro modelo propone que la adquisición de linaje ocurre independiente de las señales extrínsecas, pero que los factores de crecimiento y citoquinas son esenciales para la supervivencia, proliferación o apoptosis de la célula comprometida. Un tercer modelo combina los dos anteriores dando como resultado diversas posibilidades. Por ejemplo, la CTH pluripotente genera células multipotentes, las cuales son influenciadas por factores externos para comprometer linaje o para proliferar y madurar en células ya comprometidas.

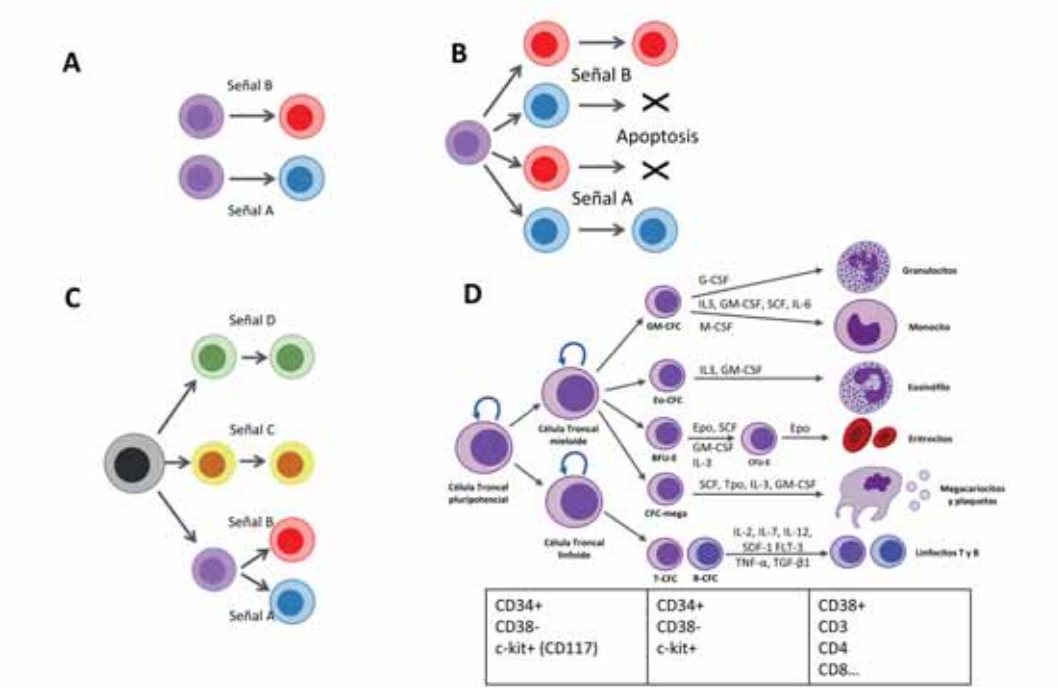


Figura 1-6. Modelos de la acción de factores externos sobre la elección de linaje celular. El modelo A representa la elección de linaje de acuerdo a la especificación de la señal recibida. En el modelo B, las señales no determinan el compromiso de linaje, pero afectan el destino de la célula comprometida. En el modelo C las señales externas afectan a células multipotentes determinando su linaje y, además, actúan sobre células ya comprometidas afectando su maduración. El modelo D muestra la influencia de factores y citoquinas en la maduración de linajes celulares.

La influencia de los factores extrínsecos sobre la elección de linaje se demostró en un experimento con células bi-potenciales obtenidas de colonias de macrófago-granulocitos o "granulocyte-macrophage colony forming cells" (GM-CFC). Si el cultivo de GM-CFC contenía el factor de crecimiento de célula troncal ("stem cell factor": SCF), las células se diferencian en granulocitos. No obstante, al ser cultivadas en presencia de factor estimulador de colonias macrofágico (M-CSF) o de interleuquina-4 (IL4), las células se diferencian a macrófagos.

En la literatura, se pueden encontrar diferentes modelos experimentales destinados al estudio de los factores de crecimiento y citoquinas en el compromiso de linaje, siendo uno de ellos los experimentos en modelos transgénicos murinos.

Un ejemplo, son los experimentos en donde se han alterado los genes que codifican para eritropoyetina (EPO) o su receptor (EPO-R) mediante recombinación homóloga. Al utilizar esta estrategia se obtuvieron ratones con anemia severa carentes de células rojas maduras, indicando que las señales depen-

dientes de EPO son requeridas para la diferenciación y maduración de células eritroides. Sin embargo, en estos ratones no se observa una disminución significativa de células eritroides progenitoras, lo que sugiere que el compromiso eritroide no se ve afectado por la ausencia de EPO y que la acción de este factor sería sobre células ya comprometidas.

Experimentos similares con otras citoquinas relacionadas a linajes y sus receptores, arrojan resultados equivalentes, apoyando el postulado que el compromiso de linaje puede ocurrir en ausencia de las señales particulares.

En la actualidad se han identificado más de 30 interleucinas y factores de crecimiento que influencian la determinación de linaje de las células madre hematopoyéticas. Se reconocen dos tipos en general: los factores que estimulan múltiples linajes (factores multilinaje o pleiotrópicos, factores de acción temprana) y los que estimulan la diferenciación y supervivencia de un solo linaje (factores de linaje dominante, o de acción tardía).

Entre los factores de acción pleiotrópica o de multilinaje, se destacan “stem cell factor” (también conocido como ligando KIT), la Interleukina 3 (IL-3), el Factor factor estimulante de colonias de granulocitos-monocitos (granulocyte-monocyte colony-stimulating factor: GM-CSF), el “insulin-like growth factor 1”, IL-9, IL-11, entre otros. Varios de estos factores también participan en la determinación de linaje individual. Es importante mencionar que estos factores pueden ser considerados en clínica para el tratamiento de condiciones que afecten múltiples linajes hematopoyéticos, tales como la pancitopenia.

Se considera un factor específico de linaje a aquel cuya expresión sea exclusiva de células progenitoras (y / o precursoras) dentro de un único linaje y, que induzca señales inhibitorias o apoptóticas en células de otros linajes.

Algunos de los ejemplos más conocidos son: la eritropoyetina, (esencial en el proceso de maduración de la serie eritropoyética) y la trombopoyetina (acción esencialmente en el linaje plaquetario).

Otros factores, dentro de esta categoría, se denominan también selectivos de linaje por ejercer acciones secundarias sobre los linajes adicionales al de su acción principal. Ejemplos de estos incluye G-CSF, que promueve principalmente la diferenciación de neutrófilos, y varias interleucinas, que tienen acciones selectivas sobre ciertos linajes mieloides y linfoides.

Desde la clínica, los factores de crecimiento específicos del linaje pueden usarse para tratar una deficiencia de un solo tipo de célula hematopoyética, por ejemplo, en cáncer.

En la Figura 1-7 se esquematiza la influencia de factores de crecimiento y de interleukinas en la determinación de linaje de la célula progenitora hematopoyética.

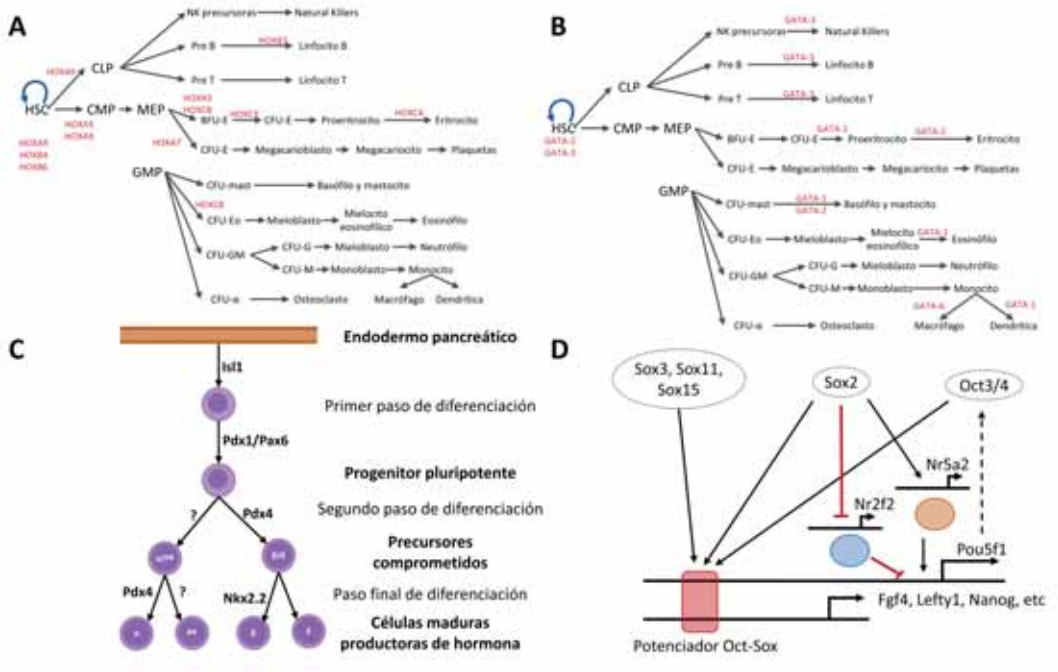


Figura 1-7. Esquema representativo de la acción de factores de crecimiento y de Interleucinas en el linaje de las células hematopoyéticas desde la célula madre.

3.8. Genes involucrados en la decisión de linaje

Estudios en humanos destinados a la determinación de la función específica de factores de crecimiento en la hematopoyesis humana, han empleado técnicas de manipulación génica, ya sea sobre-expresando o disminuyendo la expresión de genes. Un gran número de genes se han descrito como reguladores de la decisión y maduración de un linaje celular específico, por lo que a continuación se describirán aquellos que han arrojado resultados de mayor consistencia.

Familia de genes hox Las proteínas HOX pertenecen a una gran familia de factores de transcripción que comparten una secuencia de unión a DNA altamente conservada ("homeodomain"). Fueron descubiertos en Drosophila y resultaron ser cruciales en la regulación del desarrollo embrionario normal, encontrándose posteriormente que sus análogos en humanos participan en el desarrollo de una hematopoyesis normal. En mamíferos, se han descubierto 39 genes que se agrupan en cuatro grupos, A, B, C y D, conteniendo cada uno de ellos entre 8-11 genes. Aunque la función de las proteínas HOX en hematopoyesis es en extremo compleja, las evidencias experimentales indican que los genes hoxb4 están asociados con la diferenciación mieloide y los del grupo hoxc con el linaje linfoide. Evidencias *in vitro* e *in vivo* indican que HOXB3, HOXB4 y HOXB5 actúan sobre progenitores tempranos, probablemente antes de que ocurra la diferen-

ciación de linaje mieloide y eritroide, y que probablemente HOXB4 es además importante en la auto-renovación celular. Por otro lado, HOXB6 y HOXB7 parecen tener una función más tardía en la jerarquía hematopoyética, afectando la diferenciación granulocito vs monocito. El grupo de genes hoxc participa en eventos relacionados con la diferenciación linfoide temprana y tardía. Hoxc4, por ejemplo, está presente tanto en progenitores como en linfocitos T y B terminalmente diferenciados, en tanto que hoxc6 está expresado en células maduras del linaje T pero no en sus progenitoras (Figura 1-8).

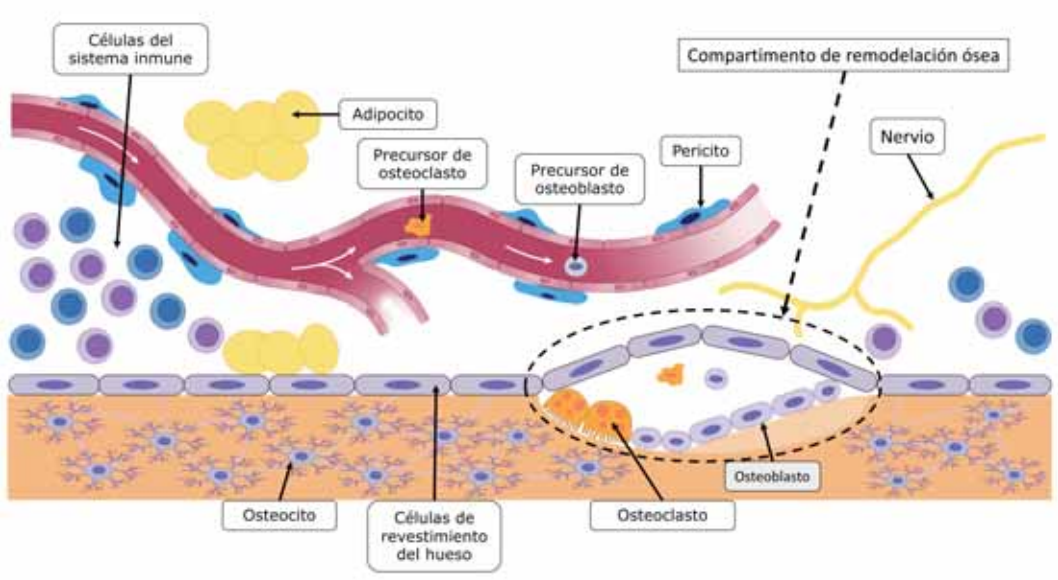


Figura 1-8. Esquema de la influencia de los genes GATA, Pax, Hox, Sox y Oct en las etapas de diferenciación de células madre hematopoyéticas.

Familia de genes gata Es una familia de factores de transcripción con dominio de unión al DNA. De ellos, tres miembros de la familia gata han sido identificados como reguladores de la expresión génica en células hematopoyéticas. GATA-1 está altamente expresado en células eritropoyéticas, mastocitos y megacariocitos y su expresión es crucial para eritropoyesis primitiva y definitiva. La pérdida de gata-1 causa anemia embrionaria fatal, debido al bloqueo de la maduración eritroide. GATA-2 también se expresa en células eritroides tempranas, mastocitos y megacariocitos, pero, además, se han observado niveles particularmente elevados en células pluripotentes (CPHs) y su expresión disminuye a medida que las células maduran. La alteración de los genes gata-2 causa letalidad en útero debido a un defecto en la hematopoyesis temprana, implicándolo en la mantención de la función de la CPHs. La expresión de gata-3 es importante en la hematopoyesis de hígado fetal y se requiere para el desarrollo de linfocitos T.

Familia de genes pax La familia de genes pax codifica para un grupo de factores de crecimiento que han sido conservados a través de millones de años de

evolución y tienen un rol en desarrollo temprano. Las proteínas PAX participan en la regulación de la organogénesis y son un factor clave en la mantención de la pluripotencialidad de las células troncales durante el desarrollo. Mutaciones en los genes pax causan defectos importantes en organismos tan diversos como moscas, ratones y humanos.

Uno de estos genes, pax-5, ha sido ampliamente estudiado en hematopoyesis, encontrándose que su expresión es crucial para la determinación del linaje linfoide B. La inactivación del gen pax-5 convierte a los linfocitos B comprometidos en progenitores hematopoyéticos tempranos multipotenciales, sugiriendo que su expresión es necesaria en forma continua para mantener el linaje linfoide B. A nivel molecular, pax-5 cumple un rol ambivalente, activando la expresión de genes específicos del linaje linfoide B y reprimiendo la transcripción de genes de un linaje inapropiado.

Proteínas morfogénicas óseas Las proteínas morfogénicas óseas o "Bone morphogenetic proteins" (BMPs) son miembros de la familia de factor de crecimiento transformante-β (TGF-β). Estas citoquinas regulan la proliferación celular, diferenciación, morfogénesis y apoptosis celular. Durante embriogénesis, estas proteínas participan en el desarrollo de tejidos y órganos, en tanto que, en tejidos maduros, mantienen la homeostasis tisular. En relación a hematopoyesis, se ha observado que BMP-4 induce la formación de tejido embrionario hematopoyético, en tanto que la presencia de BMP-2 induce un microambiente hematopoyético que contribuye al crecimiento clonogénico de progenitores mieloides y linfoides. Además de los mencionados, otros miembros de la familia TGF-β también participan con funciones específicas en las diferentes etapas de la hematopoyesis.

El continuo interés por entender la regulación de la hematopoyesis normal ha llevado a los investigadores a estudiar y descubrir múltiples genes que actúan regulando los procesos celulares en los diversos niveles de la jerarquía hematopoyética. Un foco esencial de las investigaciones ha sido la identificación de genes relacionados con la capacidad de autorenovación de la CPHs. Aunque los estudios realizados no han arrojado aún resultados concluyentes, se han postulado algunos genes como esenciales para la función de autorenovación, habilidad particular de las células troncales. Un ejemplo es el gen foxd3 necesario para la pluripotencialidad celular. Una mutación en el gen foxd3 produce embriones de corta supervivencia, en los cuales, se forma parte del saco embrionario pero la masa interna que contiene las células que formarán el cuerpo del embrión no se expande lo suficiente como para generar el embrión. Interesantemente, la adición del gen normal de foxd3 restaura el desarrollo embrionario normal. El gen foxd3, en conjunto con otros identificados anteriormente, oct4, fgf4 y sox2 parecen controlar la pluripotencialidad de las células troncales en estadios tempranos de la embriogénesis. La participación de estos genes sobre la capacidad de auto-renovación de CPHs adultas, está aún siendo investigada.

4. EL MICROAMBIENTE DE LA MÉDULA ÓSEA

El microambiente de la médula ósea está formado por un endotelio particular y un tejido conectivo estromal, combinado con citoquinas que regulan la compartimentalización, proliferación y diferenciación de las CPHs. Este microambiente o nicho medular está compuesto por células no hematopoyéticas que tienen un rol preponderante en la regulación de la hematopoyesis. Las células que conforman el microambiente de la médula ósea son las siguentes:

a) **Células derivadas de línea ósea.** las células osteoblásticas fueron la primera población celular que se asoció a CPHs. Estudios realizados con CPHs enriquecidas sugieren que estas se ubican cerca de la superficie ósea, donde hay una intensa actividad osteoblástica y con esto se promueve la proliferación hematopoyética. Sin embargo, estudios murinos con ablación medular con ganciclovir, muestran que las células derivadas de línea ósea no son capaces por sí solas de sostener y mantener las CPHs. Dentro de las moléculas que se producen en células de línea ósea, se encuentra la osteopontina que promueve proliferación de pool de CPHs, trombopoyetina, angiopoyetina las cuales unen al receptor MPL (myeloproliferative leukemia o THOR) y al receptor TIE2 (tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF domains 2). Sin embargo, la función de estas moléculas producidas por el osteoblasto y su significancia fisiológica es debatible, pues el rol preponderante de producción de trombopoyetina es en hepatocitos. Así a modo de síntesis, si bien se estima un rol del osteoblasto en regulación hematopoyética, no parece ser preponderante y menos capaz de soportar la hematopoyesis en conjunto.

b) **Células perivasculares.** el descubrimiento que las CPHs del modelo murino expresan receptores de señalización tipo SLAM (CD150, CD48, CD244) ha facilitado la purificación de estos progenitores en el microambiente. Esto sumado a que las células mesenquimales derivadas de la medula ósea tienen capacidad de diferenciación tisular a hueso, grasa y cartílago, y sobre todo de autorenovación han mostrado, en diferentes líneas de investigación, que su ubicación perisinusoidal no es fortuita. Estas células mesenquimales pueden favorecer a la organización del nicho medular e incluso al ser trasplantadas pueden favorecer la generación en modelo murino de un nicho medular independiente. En otros experimentos se ha observado que trasplantar células mesenquimales CD146 + en la cápsula renal murina promueve la formación de tejido medular ectópico. Las células perivasculares además son ricas en CXCL12, SCF, ANGPT1, OPN, IL-7, VWF y VCAM 1, todas moléculas necesarias en el mantenimiento de la CPHs.

c) **Células adiposas.** En los humanos el envejecimiento muestra una aceleración en la adiposidad de la médula ósea, lo cual es más aparente en huesos largos y así, se encuentra que la fabricación hematopoyética se reemplaza por tejido graso. La adiponectina es una proteína secretada por los adipocitos que afecta la proliferación de CPHs *in vitro*. Los ratones A-ZIP/F1

escasos en grasa ("fatless"), muestran un prendimiento hematopoyético acelerado post trasplante y se recuperan más rápido de las quimioterapias. Los ratones tratados con antagonistas PPAR (inhibidores de adipogénesis) muestran también mejor proliferación de CPHs.

d) **Células endoteliales.** La médula ósea es un tejido muy bien vascularizado que permite así la liberación de su producto al torrente sanguíneo. Las moléculas NOTCH ligando, CXCL12, SCF y pleiotrofina regulan la actividad de CPH desde el endotelio. Además, luego de quimioterapias mieloablativas las células endoteliales favorecen la recuperación. Así, en cultivos celulares, deleción de gp130, SCF, o Jag1 en células Cre impiden el mantenimiento de las CPHS, (en ausencia de adecuado estímulo endotelial). Si bien, la hipoxia se ha sugerido como un inherente factor de producción y estimulación hematopoyética, se ha podido establecer que la permeabilidad de arteriolas y sinusoides al plasma sanguíneo afecta los niveles de radicales libres de oxígeno y así mismo la localización de las CPHS. Dado que la interacción entre radicales libres de oxígeno parece ser necesario, y puesto que en estado hipóxico hay menos generación de radicales, es un tema aún debatido.

Regulación neural

La inervación de la médula ósea se ha sugerido como un factor regulador de la hematopoyesis. En tanto que los nervios parasimpáticos solo inervan la corteza y tejido medular superficial, los nervios simpáticos inervan la médula ósea de forma profunda. La liberación de noradrenalina y su interacción con los receptores adrenérgicos moviliza CPHs e interacciona con CXC12 promoviendo el egreso de estas células desde el estroma. Sumado a esto, experimentos con ablación genética de los neurotransmisores adrenérgicos suprime la respuesta migratoria de CPHs al GCSF. Si bien, este rol está bien definido, continúa en estudio cuáles nervios son los que más influyen en la regeneración hematopoyética.

Dinámica de la Hematopoyesis en el estroma

Una forma en que el estroma medular contribuye a la hematopoyesis es debido a su alto contenido de matriz extracelular rica en glicosamino-glicanos que une y distribuye factores de crecimientos, tales como el factor estimulante de colonias granulocítica-mielocítica y diversas citoquinas. En humanos, células de la médula, encontradas en relación con el ambiente hematopoyético que no tienen origen hematopoyético, incluye, además de las células endoteliales mencionadas anteriormente, pericitos y células parasinusoidales. La hematopoyesis ocurre en los espacios inter-sinusoidales y las células sanguíneas entran en la circulación sistémica pasando a través de las células endoteliales y la delgada capa de la membrana basal presente en el lado abluminal. Esto implica una interacción cercana entre células sanguíneas y células endoteliales, en donde el endotelio participaría en la retención de células inmaduras o defectuosas y en la secreción de factores que afecten el comportamiento de las células hematopoyéticas. Estas células endoteliales, presentes en los espacios

inter-sinusoidales, llamadas también reticulocitos, poseen extensiones citoplasmáticas en íntimo contacto con células hematopoyéticas y con procesos o extensiones de células reticulares presentes en los espacios inter-sinusoidales adyacentes. Las células reticulares están en contacto además con las células de la membrana basal y se ha propuesto que el grado de migración celular a los sinusoides estaría en relación con esta interacción.

El endotelio, en conjunto con la cubierta reticular, es lo que se conoce como la barrera hemato-medular la que se ha implicado en el flujo de mediadores solubles producidos en otras zonas de la cavidad medular, además de la regulación de la migración celular.

La organización de las células estromales en estos compartimentos, estarían determinando vías de inducción específicas a través de la cual una célula pluripotente hematopoyética se diferencia. Aunque estos sitios de restricción de linaje no han sido evidenciados en médula ósea de mamíferos, se ha observado un cierto grado de localización o gradiente de células inmaduras del linaje B en la región del sub-endósteo. Estudios en ratón, primates y humanos han detectado la producción de varios tipos de citoquinas en células estromales, las cuales pueden permanecer unidas a proteínas de la matriz extracelular o en componentes de la membrana de células estromales de la médula ósea, tales como heparán sulfato, otorgando en el microambiente concentraciones suficientes como para influir en la maduración y proliferación de células hematopoyéticas.

Las evidencias actuales resumen la participación del microambiente medular en hematopoyesis, otorgando a las células del sinusoide endotelial un rol en la transmigración de células hematopoyéticas maduras hacia la circulación, en tanto que células parasinusoidales con extensiones citoplasmáticas regulan la conducta celular, proveyendo citoquinas como mediadores y sitios de anclaje.

Estudios recientes indican que células de la médula ósea adulta poseen la capacidad de diferenciarse en células maduras específicas de diferentes tejidos no-hematopoyéticos, incluyendo hepatocitos, células de riñón, de pulmón, piel, del tracto gastrointestinal y en miocitos cardiacos y de tejido esquelético. El conocimiento de las señales que regulan esta plasticidad celular podría permitir el manejo controlado de la diferenciación de células de la médula ósea hacia células terminalmente diferenciadas tejido-específicas lo que otorgaría una herramienta valiosa con un enorme potencial terapéutico.

5. ASPECTOS GENERALES SOBRE MADURACIÓN DE DIFERENTES LINAJES CELULARES

5.1. Eritropoyesis

La eritropoyesis es el proceso de maduración de la serie eritropoyética desde proeritroblasto hasta glóbulo rojo Figura 1-10 A.

a) **Estadios madurativos.** Los estadios madurativos con capacidad de mitosis son: proeritroblasto, eritroblasto basófilo y eritroblasto policromático (doble mitosis). Le siguen los estadios de eritroblasto ortocromático, reticulocito y glóbulo rojo. A partir de 1 proeritroblasto se obtienen 16 eritrocitos. El proceso de maduración y diferenciación eritroblástico se caracteriza por: (i) hemoglobinización progresiva y (ii) reducción del tamaño nuclear, hasta picnosis y expulsión.

b) **Eritropoyetina.** La eritropoyetina (EPO) es una hormona glicoproteica de aproximadamente 34 kDa identificada como el regulador humoral de la eritropoyesis. La disminución del oxígeno en los tejidos (hipoxia) modula los niveles de EPO por un incremento en la expresión del respectivo gen. Normalmente la eritropoyesis ocurre a nivel basal, para reemplazar glóbulos rojos envejecidos. Se ve estimulada por disminución de la tensión de oxígeno en el ambiente, por aumento de la afinidad del oxígeno por la hemoglobina y otros estímulos que disminuyen la liberación de oxígeno a los tejidos. La EPO es un factor de crecimiento obligatorio desde la etapa de CFU-E hasta el estado eritroblasto basófilo. La producción de esta hormona aparece primariamente regulada por la demanda de oxigenación de los tejidos. En adulto la EPO se produce en gran parte por las células peritubulares localizadas en la corteza renal, aunque un informe también implica las células tubulares renales. La hipoxia renal conduce a la liberación de prostanglandinas, produciendo un incremento en los niveles de AMPc renal que conduce a una reducción en los niveles de calcio intracelular, lo que intensifica. En estados de hipoxia severa la producción de EPO aumenta sobre 1000 veces. La secreción de hormona circulante en sangre y unida a receptores expresados específicamente en células progenitoras eritroides fomentan la viabilidad, proliferación y diferenciación terminal de precursores eritroides, resultando un aumento de la masa de los eritrocitos. Señales específicas limitan la expresión del gen EPO a ciertos tejidos; en el feto la EPO es producida principalmente en el hígado y en el riñón en una pequeña proporción; en el adulto existe mayor producción de EPO en el riñón y una mínima cantidad en el hígado.

La presencia del receptor EPO (EPO-R) se ha demostrado solamente en células eritroides, incluidas CFU-E, BFU-E y levemente en glóbulos rojos. El gen de EPO que codifica para EPO, además de especificidad tisular, su expresión es modulada por agentes fisiológicos y farmacológicos.

La regulación del gen EPO por hipoxia y otros estímulos ocurre a nivel del mRNA. Tres segmentos no traducidos del gen EPO son altamente conservados en el DNA humano y murino.

- Promotor. Este contribuye a la inducibilidad del gen EPO por hipoxia. El promotor actúa sinérgicamente con la secuencia del enhancer 3' otorgando una inducción de 40 veces en respuesta a hipoxia. Este promotor se encuentra 117 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción.

- «Enhancer» 3'. Es un sitio para DNAsa hipersensitivo, hígado-específica. Se ubica en el extremo 3' del gen. La caracterización detallada del enhancer 3' de EPO permitió definir tres sitios que son críticos para la regulación de la hipoxia: (a) Secuencia CACGTGGT, ubicada al lado 5' del «enhancer»; a esta se une factor de transcripción, Factor–1 inducible por a hipoxia (HIF-1), (b) sitio de 7 pb en el enhancer 3' que tiene secuencia CACA el gen humano, y (c) sitio DR-2. La secuencia del tercer sitio en el "enhancer" EPO es una repetición de dos sitios y medio del receptor de hormona eritroide separado por 2 pb. Mutaciones en el «enhancer» inhiben la inducción hipóxica de gen EPO.
- HIF-1. El sitio HIF-1 en el enhancer 3' es el primer elemento en el gen EPO que responde a hipoxia mediante la transcripción. La hipoxia estimula la unión del factor de transcripción HIF1 al DNA. HIF-1 es un heterodímero compuesto de una subunidad α y una β. Bajo condiciones de normoxia la subunidad α es rápidamente degradada por la proteosoma ubiquinona. El HIF-1 α interacciona con coactivadores transcripcionales como p30 o CBP.

5.2. Granulomonopoyesis

La granulomonopoyesis es el proceso por el cual se forman, diferencian y maduran los granulocitos (eosinófilos, basófilos y neutrófilos) y las células del sistema fagocítico mononuclear (monocitos y macrófagos). Tanto los granulocitos como los monocitos y macrófagos derivan de células llamadas GMCFU o Unidades Formadoras de Colonias Gránulo Monocíticas. Los granulocitos siguen un patrón similar en su desarrollo en la médula ósea y en su liberación a la circulación.

a) **Estadios madurativos.** Durante el proceso de maduración y diferenciación de los granulocitos se observan las siguientes características citológicas: (i) reducción del tamaño celular, (ii) adquisición de granulación específica y (iii) segmentación nuclear. En la médula ósea el compartimiento mitótico está formado por células que tienen la capacidad de división, compuesto por mieloblastos, promielocitos y mielocitos. El compartimiento de maduración comprende metamielocitos, baciliformes y segmentados, siendo esta la célula más madura correspondiente a eosinófilos, neutrófilos o basófilos. Los monocitos y macrófagos derivan de la maduración de las CFU a monoblastos, promonocitos y monocitos, los cuales son liberados a circulación donde permanecen alrededor de 12 horas, para luego migrar a los tejidos, donde reciben el nombre de macrófagos.

b) **Factores de maduración.** Las CFU tienen la capacidad de formar y desarrollar colonias *in vitro* en medios de cultivos semisólidos, para lo cual requieren la presencia de moléculas regulatorias específicas, entre las que destacan citoquinas que actúan sobre distintas células, dependiendo de la presencia de receptores en la superficie celular. Las principales acciones de estas citoquinas son: (a) mejorar la sobrevida y proliferación celular, (b) inducir la diferenciación celular y (c) activar las células maduras. El proceso de proliferación sería estimulado por la participación de estos factores en

el paso de G0 a G I en el ciclo celular. En cultivos celulares, en los cuales se suprime la adición exógena de estos factores y se bloquea la síntesis endógena de estos, se acelera el proceso de apoptosis, y sería de esta manera como influyen en la sobrevida celular.

Entre los CSF involucrados en la granulomonopoyesis se encuentran:

- Factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF). Es secretado por linfocitos T, macrófagos, células endoteliales, fibroblastos y una variedad de células neoplásicas. Es un factor estimulador de colonias multilinaje, que promueve el crecimiento de células progenitoras pertenecientes a los linajes de neutrófilos, basófilos, eosinófilos y monocitos.
- Factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF). Es secretado por células endoteliales, fibroblastos, macrófagos, y células neoplásicas. Es un estimulador primario de la proliferación y diferenciación de las CFU comprometidas en el linaje de neutrófilos. Además, es un potente activador de neutrófilos maduros, favoreciendo la fagocitosis y quimiotaxis.
- Factor estimulador de colonias de monocitos-macrófagos (M-CSF). Es un factor de linaje específico para células progenitoras y células maduras pertenecientes al linaje monocitos-macrófagos. Tiene efectos sobre la función de monocitos maduros. Mejora la actividad antitumoral de los monocitos. Existe una forma soluble y una forma biológicamente activa unida a la membrana.
- IL-3. Es producida por linfocitos T activados, pero también por mastocitos. Estimula el crecimiento y diferenciación de múltiples linajes, incluyendo granulocitos, macrófagos, megacariocitos, eritrocitos y mastocitos. Promueve el crecimiento de células relativamente primitivas. También potencia la actividad funcional de eosinófilos, basófilos y monocitos.
- "Stem cell factor". Es una citoquina altamente pleiotrópica con múltiples actividades sobre células mieloides y linfoides; también sobre células no hematopoyéticas. Se expresa en una variedad de órganos (hígado, pulmón, riñón) y especialmente en cerebelo. Sobre las células hematopoyéticas, preferencialmente promueve el crecimiento de progenitores celulares relativamente primitivos. Este factor es producido en una forma unida a la membrana y en una forma soluble. Como factor soluble, tiene actividad limitada sobre la formación de colonias mieloides.
- «Flt-3 ligand». La identificación de este factor deriva del reconocimiento de su receptor Flt-3 en humanos. El Flt-3 se expresa en monocitos, pero no en granulocitos. Como factor aislado tiene un modesto efecto proliferativo. El papel Flt-3 es ser un factor sinérgico para las células hematopoyéticas progenitoras primitivas. Los factores de crecimiento, en forma individual, actúan sobre múltiples linajes hematopoyéticos y cada linaje puede ser regulado por varios factores. Otra propiedad de muchos factores de crecimiento es su interacción sinérgica. Por ejemplo, la máxima producción de eosinófilos *in vitro* requiere la presencia combinada de IL-3 y GM-CSF e IL-5.

5.3. Linfopoyesis

Las células B y células T presentan un proceso de diferenciación y maduración diferente, en el caso de los LB estos maduran en la médula ósea y en el caso de los LT el proceso ocurre en el Timo, ambos llamados órganos linfoides primarios.

a) **Células B.** El proceso de maduración de los linfocitos B involucra dos etapas, una antígeno-independiente, que ocurre en la médula ósea y otra antígeno-dependiente que ocurre, fundamentalmente, en los órganos linfoides secundarios (ganglios linfáticos, bazo y otros tejidos linfoides), lugar en el cual los linfocitos B específicos para un determinado antígeno, toman contacto con este. En este capítulo nos referiremos a la primera etapa. Se ha identificado una célula progenitora (linfoide) capaz de diferenciarse específicamente hacia el linaje de las células linfoides (células B, T y NK). Esta célula progenitora linfoide correspondería al estado más temprano de diferenciación linfocitaria, que se caracteriza por una alta actividad mitótica. Se requiere en esta etapa de alta proliferación. Posteriormente, y debido a la activación de un programa genético específico las células progenitoras linfoides son conducidas hacia la diferenciación del linaje B. La clasificación de los siguientes estados de diferenciación de las células B está definido, principalmente, por el re-arreglo de los genes de cadena liviana y pesada de las inmunoglobulinas y por la ausencia o presencia de marcadores de superficie celular. En el estadio pro-B, los linfocitos no producen inmunoglobulinas y se distinguen por la expresión de los marcadores CD19, CD43 y B220. En el estadio pre-B, ocurre la recombinación de los genes V-D-J de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas y la síntesis y expresión citoplasmática de la cadena pesada μ. Estas células no expresan inmunoglobulinas en su membrana, ya que aún no sintetizan la cadena liviana (L), y por lo tanto son incapaces de reconocer o responder a antígeno. Posteriormente, algunas de las cadenas H se asocian a una «cadena L de reemplazo», molécula estructuralmente similar a la cadena L normal pero que no posee la región variable de esta. La combinación de la cadena H con la cadena L de reemplazo constituyen el receptor de células pre-B (pre-BCR), el que regularía la síntesis ulterior de las cadenas L y la consiguiente maduración de los linfocitos B. En los linfocitos B inmaduros, ocurre la recombinación de los genes VJ de las cadenas livianas y por tanto la síntesis de las cadenas livianas (κ ó λ las cuales se asocian con la cadena pesada μ para generar una molécula de IgM en el citoplasma. Estos linfocitos B no pueden generar nuevas regiones variables (de cadenas L o H) en la médula ósea y se les considera funcionalmente inmaduros. De hecho, su encuentro con antígenos propios puede llevarlos a un estado anérgico (inactivación funcional) o de muerte celular más que a una activación. Sin embargo, esta es una importante etapa de selección negativa de linfocitos B autorreactivos que eventualmente podrían ocasionar enfermedades autoinmunes. Más avanzado en la maduración, los linfocitos B son capaces de co-expresar moléculas de IgM y de IgD en la membrana celular, las cuales pueden actuar como

receptores específicos para antígeno. En esta etapa los linfocitos adquieren competencia funcional. Además de la regulación génica mediada por diversos factores de transcripción y de IL-7, se conoce que proteínas tirosina quinasa de la familia Src y ciertos procesos adhesivos entre los linfocitos B en desarrollo y los elementos del estroma de la médula ósea actúan como factores inductores de la diferenciación de células B.

Los linfocitos B virgen que expresan en su membrana receptores específicos para un determinado antígeno, salen de la médula ósea y entran en la circulación periférica. A partir del estado de células B inmaduras los linfocitos experimentarían una disminución en su respuesta a la quimioquina CXCL12 lo que les permitiría escapar a la acción reclutadora de este factor y abandonar la médula ósea. En la periferia, los linfocitos B vírgenes migran a los órganos linfoides secundarios donde completarán su proceso de diferenciación.

b) Células T. Los linfocitos T se originan en la médula ósea a partir de un precursor capaz de migrar al timo, el principal órgano donde se lleva a cabo la diferenciación de los linfocitos T. Este proceso de maduración de los linfocitos T en el timo (denominados timocitos en oposición a los linfocitos T maduros que se encuentran en circulación), y la generación del repertorio de receptores de LT puede dividirse en tres etapas: (a) la migración de los progenitores de la médula ósea al timo, (b) la diferenciación de estas células progenitoras y (c) un proceso de selección.

Se postula, que los precursores de células T originados en la médula ósea expresarían en su superficie receptores de adhesión que se ligarían selectivamente al endotelio tímico permitiendo su entrada al interior del órgano. Uno de estos receptores podría ser la molécula CD34 la que interactuaría con la molécula L-Selectina presente en el estroma del Timo.

Una vez en el timo, los precursores de los linfocitos T mantienen una alta capacidad proliferativa. Durante su diferenciación, los precursores T ingresan al Timo ubicándose en la zona cortical de este. A medida que los timocitos migran hacia zonas más internas de la corteza estos van avanzando en su proceso de diferenciación. En estados finales de maduración los linfocitos T pasan desde la corteza hacia la médula y finalmente salen del timo a la periferia a través de las vías linfáticas o venas. El ambiente tímico representado por las interacciones físicas que se establecen entre los timocitos y los diferentes tipos celulares que allí se encuentran (células epiteliales, dendríticas y macrófagos) y los factores solubles que son liberados al medio externo son claves en los procesos de maduración y selección. El patrón diferencial de expresión de ciertas quimioquinas y de sus receptores, en particular CXCL12, CCL17, CCL19, CCL21, CCL22 y CCL25, estaría relacionado con la migración de los timocitos a través de los diferentes sub-compartimentos tímicos. Entre las diferentes citoquinas que las células estromales tímicas secretan, se ha identificado a IL-7 como un modulador directo de la sobrevida, diferenciación, transcripción

y re-arreglo génico del receptor de células (TCR). Además, la diferenciación de linfocitos T está sometida a un estricto control de expresión génica mediada por factores transcripcionales tales como GATA-3, E12, E47, HEB, NF-kB, Ikaros y Notch.

En el timo ocurren dos importantes eventos de selección que son centrales en la generación del repertorio de linfocitos T maduros circulantes. Uno de estos procesos permite la generación de autotolerancia eliminando o silenciando aquellos linfocitos T que poseen una alta afinidad por antígenos propios (Selección negativa). El otro proceso de selección deriva en la generación de linfocitos T maduros con un TCR capaz de reconocer el MHC (Complejo Principal de Histocompatibilidad) propio asegurando que la respuesta inmune sea restringida por MHC (Selección positiva). Estos eventos de selección, que llevan a la producción de linfocitos T «efectivos» ocurren en el timo luego de la expresión del TCR, CD4 y CD8 y antes que estas células salgan a la periferia.

5.4. MEGACARIOPOYESIS

Las plaquetas circulantes se originan a partir de los megacariocitos de la médula ósea. Una forma para estudiar la maduración megacariocítica es bajo el criterio de la microscopia de luz, según: razón núcleo/ citoplasma, forma nuclear, basofilia y gránulos citoplasmáticos.

a) Estadios madurativos. El proceso de maduración megacariocítica, citológicamente se caracteriza por: (i) poliploidía con gigantismo nuclear y (ii) acidificación del citoplasma.

Precursores megacariocíticos. Se encuentran en 1-4/1000 células nucleadas en la médula ósea. Estas no pueden ser distinguidas morfológicamente de otras células diploides.

Células progenitoras megacariocíticas. Entre las células progenitoras del linaje megacariocítico se pueden distinguir las BFU-MK, CFU-MK y LD-CFU-MK. Las células de los estadios BFU-MK y CFU-MK son CD34+, no así las células del estadio LDCFU-MK.

- Megacariocitos. Se distinguen varias etapas de maduración de los megacariocitos: Megacarioblasto o megacariocito 1. Es la célula de transición entre los precursores y las células reconocibles morfológicamente. Representa el 5 a 20% de la población megacariocítica en la médula ósea. Es una célula pequeña de 18 µm de diámetro, mononuclear, expresa marcadores específicos, pero aún no es reconocible morfológicamente; posee acetilcolinesterasa. En su citoplasma hiperbasófilo se encuentran proteínas como FvW, PF4 y GPIIb. Una forma de reconocer esta célula es a través de la peroxidasa ubicada en el retículo endosplasmático (RE).
- Promegacariocito o megacariocito II. Esta célula es de mayor tamaño (20 µm de diámetro). Se observa el sistema de demarcación de membrana (SDM) poco desarrollado, presenta abundantes ribosomas y el núcleo comienza a

lobularse. El núcleo en algunos casos se observa en forma de herradura, el citoplasma es basófilo y abundante. Representa el 25% de la población megacariocítica en la médula ósea.

- Megacariocito granular o megacariocito III. Presenta mayor tamaño que el estadio anterior (35 µm de diámetro). Representa el 56% de la población megacariocítica de la médula ósea.
- Megacariocito maduro o megacariocito Precursores megacariocíticos. Se encuentran en 1-4/1000 células nucleadas en la médula ósea. Estas no pueden ser distinguidas morfológicamente de otras células diploides. BFU: MK. Requiere 21 días para dar origen a varias colonias con alta celularidad. Es estimulada por IL-1, IL-3 y trombopoyetina (TPO) para originar CFU-MK. CFU-MK. Es un estadio más maduro; requiere de 10 a 12 días para formar colonias con baja celularidad (LD-CFU-MK) 63 IV. Es la célula más grande de la médula ósea (50-80 µm de diámetro), presenta núcleo multilobulado y poliploide, citoplasma acidófilo, con pocas mitocondrias, SDM desarrollado y presencia de gránulos citoplasmáticos.

La maduración completa de los megacariocitos demora 10 días en humanos. Los megacariocitos maduros representan el 0.02- 0.05% del total de células de la médula ósea. El número normal de megacariocitos maduros es de 6.1x 106 / Kg. En el feto, se han encontrado megacariocitos en hígado, bazo y médula ósea. En adulto los megacariocitos se pueden detectar en todos los órganos mayores, pero preferentemente en la médula ósea. Durante la maduración el desarrollo de la ploidía está dada por divisiones nucleares sucesivas sin división celular (endomitosis); el núcleo se divide a razón de múltiplos de 2 (2N, 4N, 6N, etc.). En el humano, el modelo clásico de ploidia es 16N, con tres ciclos endomitóticos. Desde el segundo estado madurativo, con un contenido de 8N, los megacariocitos son capaces de dar origen a plaquetas; dependiendo de la ploidía dan origen a plaquetas con distinta forma y densidad. Un megacariocito es capaz de producir entre 1000 y 5000 plaquetas (producción proporcional a la ploidía); el núcleo y citoplasma restante son fagocitados por macrófagos cercanos. La liberación de plaquetas a la circulación está explicada por dos modelos: (a) el modelo de "proplaquetas" en el cual SDM organizaría el citoplasma de tal manera que formaría un seudopodio, que a través de los sinusoides se extiende a la circulación y por efecto de la misma se fragmentaría y liberaría plaquetas a la sangre y (b) en el segundo modelo, el SDM no organiza el citoplasma pero es igualmente importante, ya que se fragmenta la membrana redundante y se liberan plaquetas.

b) Regulación. La regulación del proceso megacariocítico se realiza por un mecanismo humoral en el que se responde al número de plaquetas en circulación. En este proceso participan varias citoquinas, siendo la más importante la TPO (o c-MPL ligand), una glicoproteína de 15-48 kDa. Se ha encontrado mRNA para TPO en el hígado y riñones, siendo el primero el lugar de mayor producción. La TPO es sintetizada en forma constitutiva y liberada a la circulación según la unión a su receptor (c-MPL). La TPO presenta un 75% de homología en la secuencia aminoacídica, con la eritropoyetina, lo que ha permitido

postular que se originaron en un gen común, encontrado en el cromosoma 3. La TPO se une a su receptor c-MPL ubicado en los megacariocitos, estimulando así la maduración megacariocítica con el consiguiente aumento de ploidía y maduración citoplasmática. El c-MPL estimula segundos mensajeros que activan la tirosina kinasa JAK2 y la fosforilación de proteínas que activan la trascripción STAT. Las JAKs tirosinas quinasas de la familia de las JANUS kinasa no tienen actividad tirosina kinasa intrínseca por lo que deben unirse a otras proteínas kinasas (PTK). Se ha demostrado que la activación de JAK lleva a la fosforilación de proteínas estimuladoras y activadoras de la transcripción (factores de transcripción), las llamadas STAT; estas una vez fosforiladas pueden translocarse al núcleo de la célula y activar la transcripción.

6. ESTUDIO DE LA HEMATOPOYESIS

Varios procedimientos pueden ser utilizados para evaluar la hematopoyesis:

Hemograma. El estudio cuanti y cualitativo de las células de la sangre periférica (hemograma) es un primer e importante procedimiento para estudiar el estado de la hematopoyesis.

Mielograma. El mielograma es el estudio citológico de las series: eritroblástica, granulocítica, agranulocítica y megacariocítica de un aspirado de médula ósea.

Biopsia de médula ósea. A diferencia del mielograma, en este caso se trata de un estudio histológico y por tanto puede evaluar también la arquitectura medular, pero no puede estudiar los aspectos citológicos.

Ferrocinética. Básicamente se trata de administración de Fe59-transferrina y medida de desaparición del plasma, aparición de eritrocitos marcados.

Citometría de Flujo. La citometría de flujo ha permitido organizar de forma didáctica y jerárquica la generación hematopoyética. El descubrimiento de los “clusters” de diferenciación celular han permitido que por medio de anticuerpos monoclonales específicos puedan detallarse de forma precisa el estado madurativo de cada célula progenitora hematopoyética y su producción. A modo de ejemplo está definido que la CPH porta como antígenos de superficie el CD34 y TDT y según su diferenciación puede reconocerse la línea linfoide por la expresión de CD3 CD4 CD8 CD20 y CD23 la línea mieloide por expresión de HLA DR, CD15, CD33, y la línea eritroide por expresión de CD55 CD59.

7. LECTURAS SUGERIDAS

Pinho S, Frenette PS. Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche. Nat Rev Mol Cell Biol. 2019 May;20(5):303-320. doi: 10.1038/s41580-019-0103-9. PMID: 30745579; PMCID: PMC6483843.

Seshadri M, Qu CK. Microenvironmental regulation of hematopoietic stem cells and its implications in leukemogenesis. Curr Opin Hematol. 2016 Jul;23(4):339-45. doi: 10.1097/MOH.0000000000000251. PMID: 27071022; PMCID: PMC5086033.

Mendelson A, Frenette PS. Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration. Nat Med. 2014 Aug;20(8):833-46. doi: 10.1038/nm.3647. PMID: 25100529; PMCID: PMC4459580.

Haas S, Trumpp A, Milsom MD. Causes and Consequences of Hematopoietic Stem Cell Heterogeneity. Cell Stem Cell. 2018 May 3;22(5):627-638. doi: 10.1016/j.stem.2018.04.003. PMID: 29727678.

Groarke EM, Young NS. Aging and Hematopoiesis. Clin Geriatr Med. 2019 Aug;35(3):285-293. doi: 10.1016/j.cger.2019.03.001. Epub 2019 May 9. PMID: 31230730; PMCID: PMC8131033.

Bazinet A, Popradi G. A general practitioner's guide to hematopoietic stem-cell transplantation. Curr Oncol. 2019 Jun;26(3):187-191. doi: 10.3747/co.26.5033. Epub 2019 Jun 1. PMID: 31285665; PMCID: PMC6588058.

Sidney LE, Branch MJ, Dunphy SE, Dua HS, Hopkinson A. Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. Stem Cells. 2014 Jun;32(6):1380-9. doi: 10.1002/stem.1661. PMID: 24497003; PMCID: PMC4260088.

Szilvassy SJ. The biology of hematopoietic stem cells. Archives of medical research. 2003;34(6):446-60.

Bert Wognum, Ning Yuan, Becky Lai, Cindy L Miller. Colony forming cell assays for human hematopoietic progenitor cells. Methods Mol Biol. 2013; 946:267-83. doi: 10.1007/978-1-62703-128-8_17.

Capítulo

2

ERITROPOYESIS

María Elena Cabrera, Eduardo Retamales, Iván Palomo

Resumen

1. **Introducción**

2. **Eritropoyesis**
   2.1. Estadios madurativos
   2.2. Regulación de la eritropoyesis. Eritropoyetina

3. **Lecturas sugeridas**

RESUMEN

La hematopoyesis es un proceso finamente regulado de maduración y diferenciación celular que da origen a los tres tipos de células sanguíneas (glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas). Durante la gestación, inicialmente ocurre en el saco vitelino, luego en el bazo e hígado fetal y, hacia el final del embarazo comienza a ocurrir en la médula ósea (ver adicionalmente capítulo 1, 3 y 4). Las células sanguíneas producidas son liberadas desde la médula ósea a la sangre periférica.

En particular, la eritropoyesis es el proceso de producción, proliferación y maduración de la serie eritroide o roja. El origen de la eritropoyesis son las células pluripotenciales o madres comprometidas que a través de un proceso finamente regulado con factores de crecimiento y diferenciación. La eritropoyesis está regulada por citoquinas, entre ellas, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-GSF), factor de células madre (SCF), IL 1, 3, 4, 6, 9, 11, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor de crecimiento insulínico (IGF-1) y eritropoyetina (EPO).

En este capítulo se revisan los aspectos más importantes de la eritropoyesis, relacionado a estadios de progenitores, precursores y células maduras. Se destaca la participación de la hormona eritropoyetina (EPO) en la regulación del proceso de inducción de la proliferación y maduración del eritrón.

1. INTRODUCCIÓN

Las glóbulos rojos o serie roja al igual que la serie blanca o leucocitaria y serie plaquetaria o plaquetas se originan en la médula ósea mediante un complejo proceso de diferenciación y maduración celular. Particularmente la eritropoyesis da origen a los glóbulos rojos (eritrocitos o hematíes), proceso que al igual que los otros 2 sistemas de la hematopoyesis (leucopoyesis y trombopoyesis) son finamente regulados por citocinas. En el caso de la eritropoyesis tiene una destacada participación la eritropoyetina (EPO) como factor estimulante eritropoyético, formando todos parte del microambiente hematopoyético, el cual está constituido por fibroblastos, macrófagos células endoteliales, osteoblastos y adipocitos, en conjunto constituye el estroma medular.

2. ERITROPOYESIS

La eritropoyesis es el proceso de maduración de la hematopoyesis desde proeritroblasto hasta glóbulo rojo como parte integrante del eritrón; la primera eritropoyesis se da entre el día 15 y 18 de la vida embrionaria en el saco vitelino (fase mesoblástica). La eritropoyesis definitiva ocurre primero en el hígado fetal y luego se realiza en médula ósea (recién nacido). En este periodo se produce

en los huesos planos, en el periodo de la pubertad en el esternón, vértebras, huesos iliacos y costillas; este eritrón es el tejido líquido que circula en sangre periférica y profunda de toda la economía corporal. Los eritrocitos se forman a partir de los eritroblastos nucleados de la médula ósea y al madurar terminan por eliminar el núcleo que es fagocitado por los macrófagos presentes en el hígado, médula ósea y bazo. Transcurridos los 120 días de vida del glóbulo rojo, su destrucción se produce en el sistema retículo endotelial liberando cadenas de globina, grupo hem e hierro. Las globinas constituidas por cadenas polipeptídicas pasan a formar el pool de aminoácidos, el grupo hem se degrada a pigmento de bilirrubina y el hierro es reciclado.

2.1. Estadios madurativos

En cada segundo el cuerpo humano genera 2 millones de glóbulos rojos, a través del proceso de la eritropoyesis. Los eritrocitos representan las células más numerosas de la sangre del adulto, existiendo alrededor de 5,0 $x10^6$ eritrocitos por microlitro (µL), el rango normal es de 4,7 $x10^6$ a 6,1 $x10^6$ en el hombre y 4,2 $x10^6$ a 5,4 $x10^6$ en la mujer.

La eritropoyesis es un proceso de varios pasos desde la célula madre hematopoyética multipotente (CMH) *(stem cell)* hasta el eritrocito maduro. Los primeros pasos de la diferenciación eritroide produce la diferenciación de la CMH a un progenitor eritroide comprometido, de este a un progenitor eritroide-megacariocítico y finalmente a una unidad formadora en brote eritroide (*burst-forming unit-erythroid*: BFU-E, en inglés). Estas células se caracterizan por ser las primeras progenitoras comprometidas de la línea eritroide. A su vez, estas se diferencian en unidades formadoras de colonias eritroide (*colony unit-erythroid*: CFU-E en inglés). En este periodo participan diversas moléculas como factores de crecimiento (GM-CSF y SCF), factores de transcripción SCL/tol1, GATA1, GATA2, GATA3, KLF1 y miARN. Estos factores son importantes en el desarollo de los diferentes estadios de la serie roja porque son los encargados del proceso de maduración (KLF1), transcripción de proteínas hematopoyéticas (GATA1, GATA2 y GATA3), estimulación del eritrón (EPO) y factor inductor de la hipoxia (HIF). En el caso del miARN se encargan de regular negativamente la expresión de genes diana mediante la degradación o inhibición del ARNm.

La segunda fase de la maduración eritropoyética consiste en la diferenciación de los precursores nucleados desde el proeritroblasto al eritroblasto basófilo, policromático y ortocromático. Esta fase es caracterizada por la síntesis y acumulación gradual de hemoglobina, disminución del tamaño celular y picnosis nuclear, terminando en la exonucleación.

La fase final del desarrollo eritroide consiste en la maduración del reticulocito en eritrocito. En esta etapa el eritrocito adquiere la forma bicóncava, remodelando la membrana. Pasan a la circulación a través de poros citoplasmáticos de las células endoteliales y permanecen en ella entre 90 y 120 días y, en el caso de los eritrocitos dañados o senescentes son removidos por los macrófagos del sistema reticuloendotelial.

A partir de un proeritroblasto se obtienen 16 eritrocitos (figura 2-1).

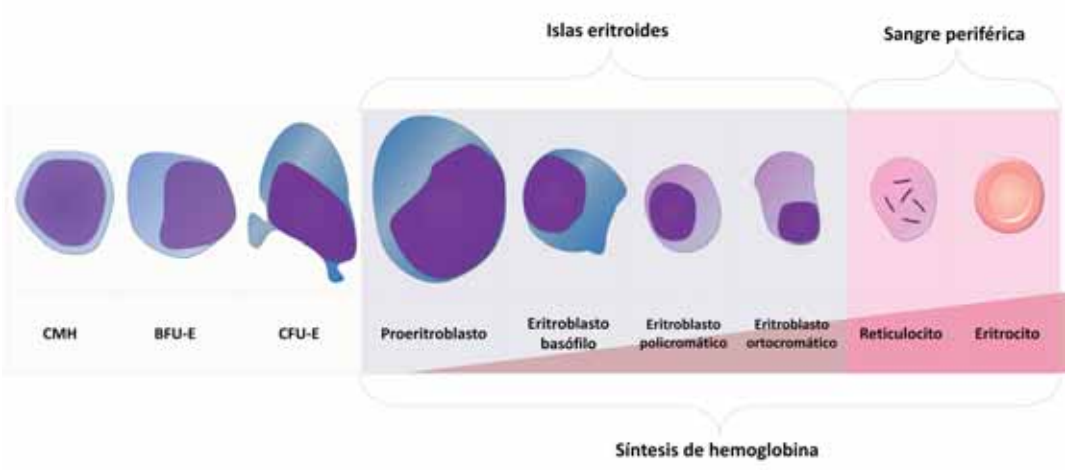


Figura 2-1. Estadios madurativos de la eritropoyesis.

Todo este proceso madurativo, ocurre en lugares especializados de la médula ósea roja, denominados islas eritroides (Figura 2-2). Estas islas están formadas por macrófagos rodeados de hasta 30 células eritroides en variados estadios de maduración. En este sitio ocurre la transferencia del hierro de parte del macrófago al progenitor eritroide para la síntesis del grupo HEM y a su vez, la fagocitosis del núcleo expulsado por el eritroblasto ortocromático.

La eritropoyesis ocurre en un balance de destrucción y producción de eritrocitos circulantes de 1% al día.

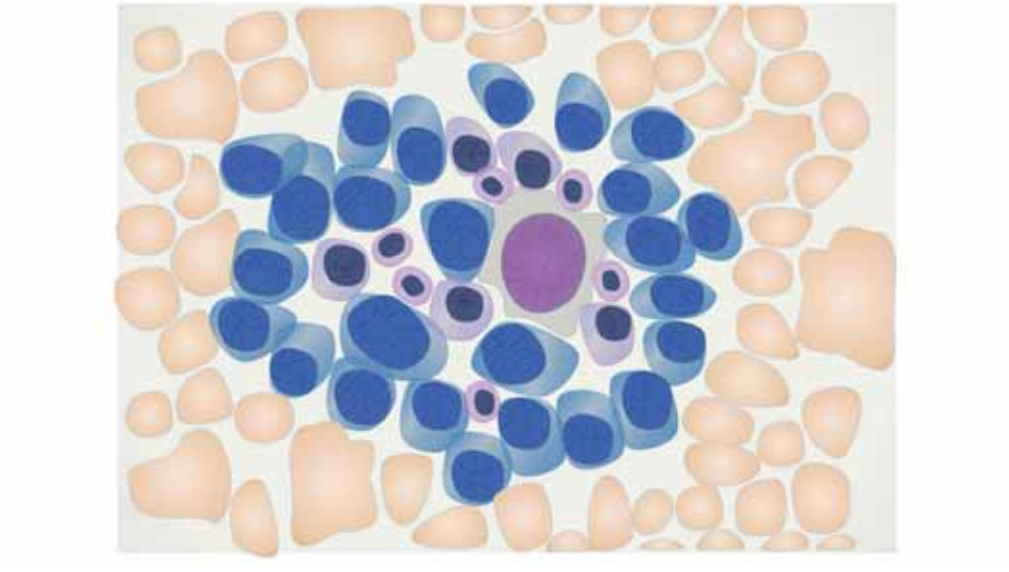


Figura 2-2. Islas eritroides. Macrófago rodeado de eritroblastos en maduración.

2.2. Regulación de la eritropoyesis. Eritropoyetina

La EPO es el principal regulador de la eritropoyesis que promueve la sobrevida, proliferación y diferenciación de los progenitores eritroides. Para cumplir con esta función la EPO se une y activa al receptor de la EPO (R-EPO) en la superficie de los precursores eritroides.

La EPO es una citoquina producida en las células endoteliales de los capilares peritubulares de la corteza renal de un adulto, en respuesta a la baja tensión de oxígeno. Su acción está dirigida principalmente a los progenitores CFU-E y proeritroblastos para mantener su sobrevida y facilitar el proceso madurativo. Además, la EPO puede estimular la proliferación de la CMH para que se canalice hacia la línea eritroide.

Presión de oxígeno. La producción de EPO está regulada por la cantidad de oxígeno que llega al riñón. Su disminución por hipoxia, anemia o isquemia renal o personas que residen en sitios sobre 3000 metros sobre el nivel del mar o con enfermedad pulmonar, estimulan la producción de EPO. En contraposición, condiciones que reducen la necesidad de oxígeno como el hipotiroidismo y el hipopituitarismo producen disminución de EPO.

El mecanismo por el cual la **hipoxia** conduce la síntesis de EPO radica en la activación del gen de la EPO. El gen de la EPO es activado por un factor inducible por hipoxia (*hypoxia inducible factor*: HIF-1 en inglés) se une a la región sensible de hipoxia en este gen, denominada elemento de respuesta a hipoxia (HRE). La activación estimula la transcripción de la EPO e inicia su acción. Este factor, es un mediador clave en la adaptación celular a la baja presión de oxígeno, constituido por un heterodímero compuesto por dos subunidades, una proteína lábil al oxígeno α y otra ß. Bajo condiciones de normoxia la subunidad α (HIF-1 α) es rápidamente degradada por la proteosoma ubiquitina, en su condición de hidroxilada. En cambio, posterior a la exposición de la hipoxia la concentración y actividad transcripcional del HIF-1α aumenta en forma geométrica, dado que no se encuentra hidroxilada (en consecuencia no es degradada) y se transloca al núcleo donde se heterodimeriza con HIF-ß y actúan como factor de transcripción para la EPO.

Este sistema es un regulador fisiológico de la transcripción de EPO y funciona como un *feedback*, en que la disminución de la concentración de oxígeno estimula la producción de EPO y un aumento de oxígeno, la inhibe. En estados de hipoxia severa la producción de EPO puede aumentar sobre 1000 veces.

La EPO induce la eritropoyesis a través de la estimulación del receptor de EPO (R-EPO) en la superficie de los precursores eritroides de la médula ósea, desde la etapa CFU-E hasta el eritroblasto basófilo para estimular la sobrevida, proliferación y diferenciación y, así aumentar el transporte de oxígeno de la sangre. Después de la unión de la EPO a su R-EPO, el receptor envía señales activando JAK2 que a su vez fosforila y activa STAT5. Una sola molécula de EPO se une a

dos moléculas de R-EPO que estimula la tirosina kinasa JAK2 y esta activa STAT5 que entra al núcleo para activar los genes que promueven el desarrollo eritroide (Figura 2-3).

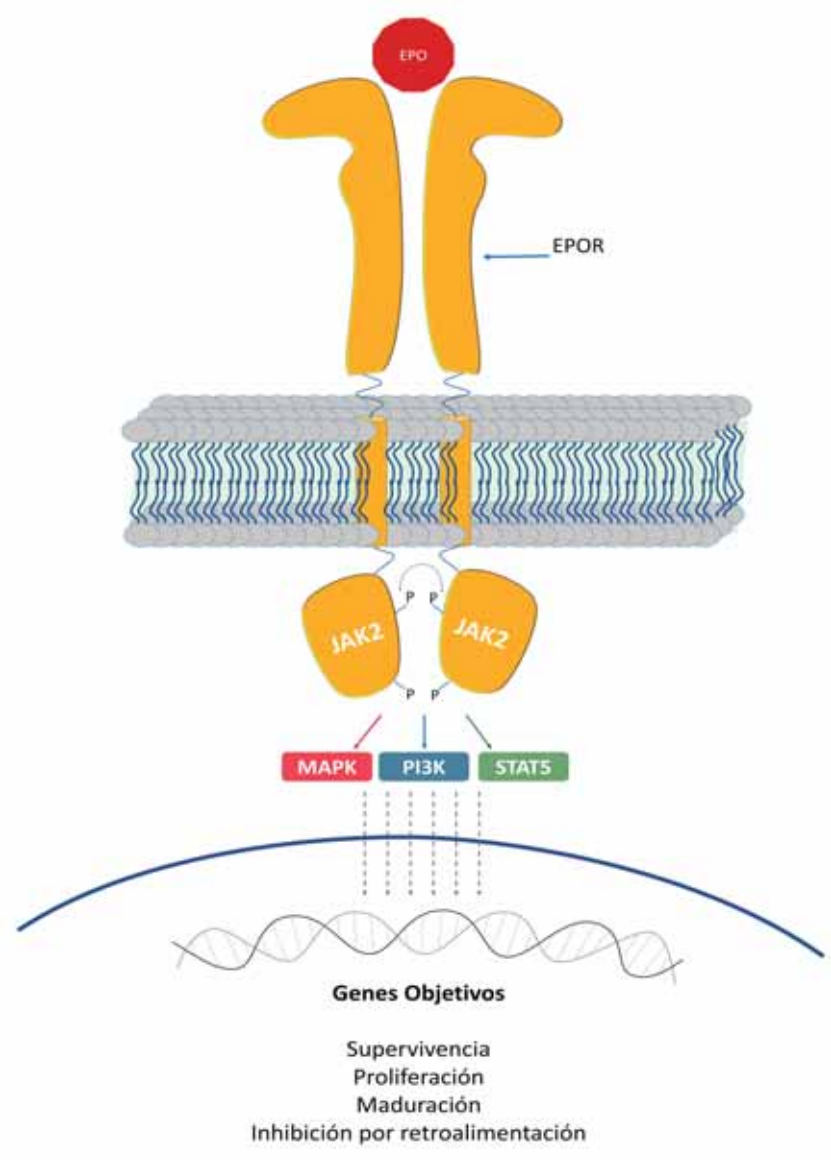


Figura 2-3. Activación del receptor de eritropoyetina (R-EPO) por la eritropoyetina (EPO) y las señales vía JAK2/STAT.

Se ha demostrado que esta vía es fundamental para la sobrevida, proliferación y diferenciación de los progenitores eritroides. Esta fosforilación es esencial para acelerar la eritropoyesis en momentos de hipoxia. Se ha identificado que la vía "JAK2/STAT5" se encuentra activa permanentemente en los casos de policitemia vera.

La proteína GATA-1 es el principal regulador de la diferenciación y sobrevida de los progenitores eritroides. Estimula genes comprometidos con la síntesis de HEM y de globinas, y del receptor de eritropoyetina (R-EPO). Estas proteínas también regulan la diferenciación de los progenitores eritroides y la proliferación de las CMH.

Además del nivel de oxígeno en la sangre, existen otros reguladores de la producción de EPO. Entre ellos, la hormona tiroidea, andrógenos, corticoides, vitamina B12 (cianocobalamina), vitamina B9 (ácido fólico), hierro y reguladores del metabolismo del hierro, como receptores de transferrina 1 y 2. La testosterona interviene indirectamente en la eritropoyesis, al regular los niveles de hierro en la sangre. Esta hormona suprime la transcripción de hepcidina (hormona peptídica producida en hígado, elemento central en la regulación de hierro al plasma a partir de la absorción del mineral presente en la dieta (1-2 mg), reciclaje de los eritrocitos (20 mg/día) o la movilización de las reservas en hígado y macrófagos). Actúa sobre células diana (enterocitos y macrófagos), impide la absorción de hierro en el intestino y la liberación de este desde los macrófagos que reciclan el hierro. La menor cantidad de hepcidina, conduce el aumento de la absorción intestinal de hierro, que expresa una mayor disponibilidad de hierro en la sangre, estimulando la eritropoyesis.

Está demostrado que existe una correlación directa entre el nivel de testosterona con el nivel de hemoglobina. Un estudio en varones sanos entre 30 y 94 años, demostró que el aumento de 1 desviación estándar de testosterona total (4,8 nmol/L), la hemoglobina aumenta 0,14 g/dl (0,95% de la media) y en presencia de testosterona libre, aumenta aún más: 0,22 g/dl (1,46%). Por otro lado, la desnutrición, hipoproteinemia y citoquinas inflamatorias como la interleuquina 6 y factor de necrosis tumoral disminuyen la producción de EPO y contribuyen a la anemia de las enfermedades crónicas y cáncer.

3. LECTURAS SUGERIDAS

Zivot A, Lipton JM, Narla A, and Blanc L. Erythropoiesis: insights into pathophysiology and treatments in 2017. Molecular Medicine. 2018; 24:11.

Yeap BB, Beilin J, Shi Z, Knuiman MW, Olynyk JK, Bruce DG, Milward EA. Serum testosterone levels correlate with haemoglobin in middle-aged and older men. Intern Med J. 2009 Aug;39(8):532-8.

Haase VH. Hypoxic regulation of erythropoiesis and iron metabolism. Am J Physiol Renal Physiol. 2010 Jul;299(1):F1-13.

Dzierzak E , Philipsen S. Erythropoiesis: development and differentiation. Cold Spring Harb Perspect Med. 2013 Apr 1;3(4):a011601.

Bhoopalan SV, Huang LJ-S, Weiss MJ. Erythropoietin regulation of red blood cell production: from bench to bedside and back. F1000Res. 2020 Sep 18;9:F1000 Faculty Rev-1153.

Capítulo

3

LEUCOPOYESIS

Marcelo Alarcón, Carolina Espinoza, Eduardo Fuentes, Ulises Vergara, Iván Palomo

Resumen

1. Introducción

2. Granulomonopoyesis
2.1. Estadios madurativos
2.2. Factores de maduración

3. Linfopoyesis
3.1. Células B
3.2. Células T
3.3. Células ILC

4. Lecturas sugeridas

RESUMEN

Las células sanguíneas (glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas) se forman en la médula ósea a partir de células pluripotentes, a través de un proceso finamente regulado. Una característica distintiva del sistema hematopoyético es que las células maduras poseen una vida media corta, de modo que la hematopoyesis es necesariamente un proceso continuo durante la vida. En mamíferos, el sistema hematopoyético comprende una jerarquía de células en donde la célula troncal hematopoyética o "stem cell", es la base. En este contexto, la leucopoyesis se refiere al proceso de generación de leucocitos a partir de las células madres hematopoyéticas pluripotentes de la médula ósea. En este capítulo se revisan los aspectos más importantes de la granulopoyesis y linfopoyesis.

1. INTRODUCCIÓN

Las células sanguíneas (glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas) se originan en la médula ósea mediante un complejo proceso de diferenciación y maduración celular. En este proceso denominado hematopoyesis participan varios factores de maduración. También es fundamental la participación de las moléculas de adhesión celular, presentes en las células hematopoyéticas, en las células del estroma y en la matriz extracelular. Este capítulo describirá los aspectos fisiológicos fundamentales de la leucopoyesis.

2. GRANULOMONOPOYESIS

La granulomonopoyesis es el proceso por el cual se forman, diferencian y maduran los granulocitos (eosinófilos, basófilos y neutrófilos) y las células del sistema fagocítico mononuclear (monocitos y macrófagos).

Tanto los granulocitos como los monocitos y macrófagos, derivan de células llamadas Unidad Formadora de Colonias de Granulocitos-Macrófagos (GM-CFU).

Los granulocitos siguen un patrón similar en su desarrollo en la médula ósea y en su liberación a la circulación.

2.1. Estadios madurativos

Durante el proceso de maduración y diferenciación de los granulocitos se observan las siguientes características citológicas: (i) reducción del tamaño celular, (ii) adquisición de granulación específica y (iii) segmentación nuclear.

En la médula ósea el compartimiento mitótico está formado por células que tienen la capacidad de división, compuesto por mieloblastos, promielocitos y mielocitos. El compartimiento de maduración comprende metamielocitos, ba-

ciliformes y segmentados, siendo esta la célula más madura correspondiente a eosinófilos, neutrófilos o basófilos (Figura 3-1).

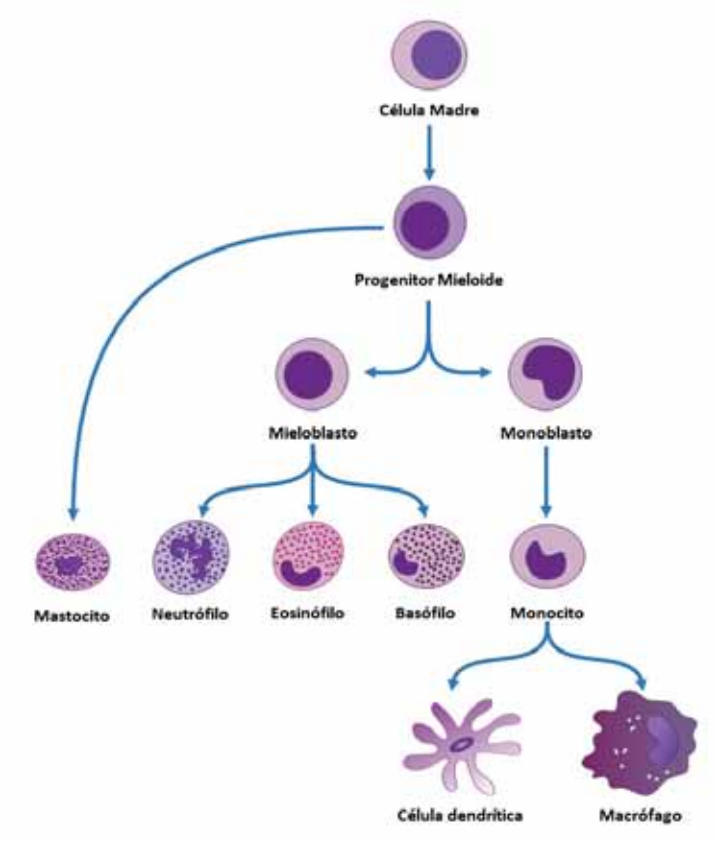


Figura 3-1. Estadios madurativos de la granulomonopoyesis.

Los monocitos y macrófagos derivan de la maduración de las CFU a monoblastos, promonocitos y monocitos, los cuales son liberados a circulación donde permanecen alrededor de 12 horas, para luego migrar a los tejidos, donde reciben el nombre de macrófagos.

2.2. Factores de maduración

Las CFU tienen la capacidad de formar y desarrollar colonias in vitro en medios de cultivos semisólidos, para lo cual requieren la presencia de moléculas regulatorias específicas, entre las que destacan citoquinas que actúan sobre distintas células, dependiendo de la presencia de receptores en la superficie celular.

Las principales acciones de estas citoquinas son: (a) mejorar la sobrevida y proliferación celular, (b) inducir la diferenciación celular y (c) activar las células maduras. El proceso de proliferación sería estimulado por la participación de estos factores en el paso de G0 a G I en el ciclo celular. En cultivos celulares, en los cuales se suprime la adición exógena de estos factores y se bloquea la síntesis

endógena de estos, se acelera el proceso de apoptosis, y sería de esta manera como influyen en la sobrevida celular.

Entre los CSF involucrados en la granulomonopoyesis se encuentran:

Factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF). Es secretado por linfocitos T, macrófagos, células endoteliales, fibroblastos y una variedad de células neoplásicas. Es un factor estimulador de colonias multilinaje, que promueve el crecimiento de células progenitoras pertenecientes a los linajes de neutrófilos, basófilos, eosinófilos y monocitos.

Factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF). Es secretado por células endoteliales, fibroblastos, macrófagos, y células neoplásicas. Es un estimulador primario de la proliferación y diferenciación de las CFU comprometidas en el linaje de neutrófilos. Además, es un potente activador de neutrófilos maduros, favoreciendo la fagocitosis y quimiotaxis.

Factor estimulador de colonias de monocitos-macrófagos (M-CSF). Es un factor de linaje específico para células progenitoras y células maduras pertenecientes al linaje monocitos-macrófagos. Tiene efectos sobre la función de monocitos maduros. Mejora la actividad antitumoral de los monocitos. Existe una forma soluble y una forma biológicamente activa unida a la membrana.

IL-3. Es producida por linfocitos T activados, pero también por mastocitos. Estimula el crecimiento y diferenciación de múltiples linajes, incluyendo granulocitos, macrófagos, megacariocitos, eritrocitos y mastocitos. Promueve el crecimiento de células relativamente primitivas. También potencia la actividad funcional de eosinófilos, basófilos y monocitos.

“Stem cell factor". Es una citoquina altamente pleiotrópica con múltiples actividades sobre células mieloides y linfoides; también sobre células no hematopoyéticas. Se expresa en una variedad de órganos (hígado, pulmón, riñón) y especialmente en cerebelo. Sobre las células hematopoyéticas, preferencialmente promueve el crecimiento de progenitores celulares relativamente primitivos. Este factor es producido en una forma unida a la membrana y en una forma soluble. Como factor soluble, tiene actividad limitada sobre la formación de colonias mieloides.

"Flt-3 ligand". La identificación de este factor deriva del reconocimiento de su receptor Flt-3 en humanos. El Flt-3 se expresa en monocitos, pero no en granulocitos. Como factor aislado tiene un modesto efecto proliferativo. El papel Flt-3 es ser un factor sinérgico para las células hematopoyéticas progenitoras primitivas.

Los factores de crecimiento, en forma individual, actúan sobre múltiples linajes hematopoyéticos y cada linaje puede ser regulado por varios factores. Otra propiedad de muchos factores de crecimiento, es su interacción sinérgica. Por

ejemplo, la máxima producción de eosinófilos in vitro, requiere la presencia combinada de IL-3 y GM-CSF e IL-5.

3. LINFOPOYESIS

3.1. Células B

Las células B y células T presentan un proceso de diferenciación y maduración diferente, en el caso de los LB estos maduran en la médula ósea y en el caso de los LT el proceso ocurre en el Timo, ambos llamados órganos linfoides primarios. El proceso de maduración de los linfocitos B involucra dos etapas, una antígeno-independiente, que ocurre en la médula ósea y otra antígeno-dependiente que ocurre, fundamentalmente, en los órganos linfoides secundarios (ganglios linfáticos, bazo y otros tejidos linfoides), lugar en el cual los linfocitos B específicos para un determinado antígeno, toman contacto con este. En este capítulo nos referiremos a la primera etapa.

Se ha identificado una célula progenitora (linfoide) capaz de diferenciarse específicamente hacia el linaje de las células linfoides (células B, T y NK). Esta célula progenitora linfoide correspondería al estado más temprano de diferenciación linfocitaria, que se caracteriza por una alta actividad mitótica. Se requiere en esta etapa de alta proliferación. Posteriormente, y debido a la activación de un programa genético específico las células progenitoras linfoides son conducidas hacia la diferenciación del linaje B. La clasificación de los siguientes estados de diferenciación de las células B está definido, principalmente, por el rearreglo de los genes de cadena liviana y pesada de las inmunoglobulinas y por la ausencia o presencia de marcadores de superficie celular.

Estadio pro-B. No producen inmunoglobulinas y se distinguen por la expresión de los marcadores CD19, CD43 y B220.

Estadio pre-B. Ocurre la recombinación de los genes V-D-J de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas y la síntesis y expresión citoplasmática de la cadena pesada μ. Estas células no expresan inmunoglobulinas en su membrana, ya que aún no sintetizan la cadena liviana (L), y por lo tanto son incapaces de reconocer o responder a antígeno. Posteriormente, algunas de las cadenas H se asocian a una "cadena L de reemplazo", molécula estructuralmente similar a la cadena L normal pero que no posee la región variable de esta. La combinación de la cadena H con la cadena L de reemplazo constituyen el receptor de células pre-B (pre-BCR), el que regularía la síntesis ulterior de las cadenas L y la consiguiente maduración de los linfocitos B.

Linfocitos B inmaduros. Ocurre la recombinación de los genes VJ de las cadenas livianas y por tanto la síntesis de las cadenas livianas (κ ó λ) las cuales se asocian con la cadena pesada μ para generar una molécula de IgM en el citoplasma. Estos linfocitos B no pueden generar nuevas regiones variables (de cadenas L o H) en la médula ósea y se les considera funcionalmente inmaduros.

De hecho, su encuentro con antígenos propios puede llevarlos a un estado anérgico (inactivación funcional) o de muerte celular más que a una activación. Sin embargo, esta es una importante etapa de selección negativa de linfocitos B autorreactivos que eventualmente podrían ocasionar enfermedades autoinmunes.

Linfocitos B maduros. Los linfocitos B son capaces de co-expresar moléculas de IgM y de IgD en la membrana celular, las cuales pueden actuar como receptores específicos para antígeno. En esta etapa los linfocitos adquieren competencia funcional (Figura 3-2). Además de la regulación génica mediada por diversos factores de transcripción y de IL-7, se conoce que proteínas tirosina quinasa de la familia Src y ciertos procesos adhesivos entre los linfocitos B en desarrollo y los elementos del estroma de la médula ósea actúan como factores inductores de la diferenciación de células B.

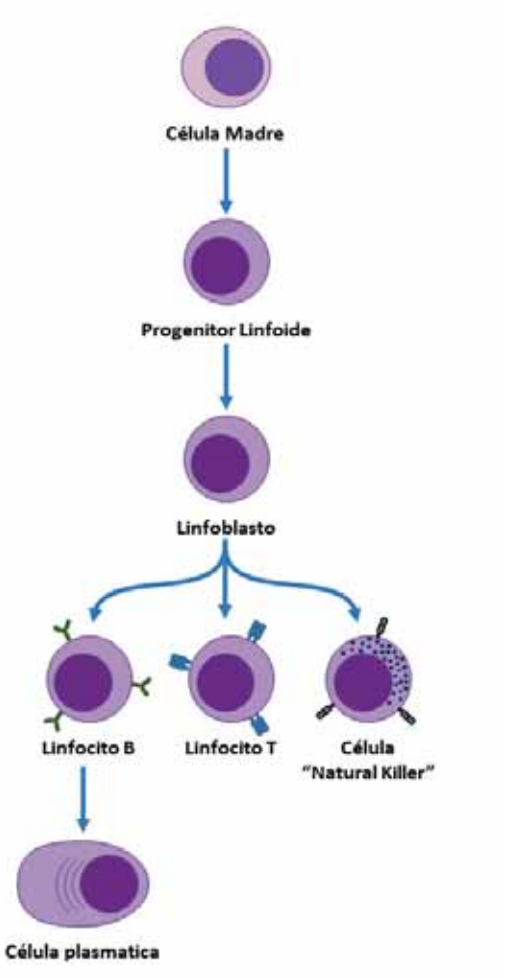


Figura 3-2. Etapas en la maduración de los linfocitos B.

Los linfocitos B virgen que expresan en su membrana receptores específicos para un determinado antígeno, salen de la médula ósea y entran en la circulación periférica. A partir del estado de células B inmaduras los linfocitos experi-

mentarían una disminución en su respuesta a la quimioquina CXCL12 lo que les permitiría escapar a la acción reclutadora de este factor y abandonar la médula ósea. En la periferia, los linfocitos B vírgenes migran a los órganos linfoides secundarios donde completarán su proceso de diferenciación.

3.2. Células T

Los linfocitos T se originan en la médula ósea a partir de un precursor capaz de migrar al timo, el principal órgano donde se lleva a cabo la diferenciación de los linfocitos T. Este proceso de maduración de los linfocitos T en el timo (denominados timocitos en oposición a los linfocitos T maduros que se encuentran en circulación), y la generación del repertorio de receptores de LT puede dividirse en tres etapas: (a) la migración de los progenitores de la médula ósea al timo, (b) la diferenciación de estas células progenitoras y (c) un proceso de selección.

Migración de los precursores de linfocitos T

Se postula, que los precursores de células T originados en la médula ósea expresarían en su superficie receptores de adhesión que se ligarían selectivamente al endotelio tímico permitiendo su entrada al interior del órgano. Uno de estos receptores podría ser la molécula CD34 la que interactuaría con la molécula L-Selectina presente en el estroma del Timo.

Una vez en el timo los precursores de los linfocitos T mantienen una alta capacidad proliferativa.

Diferenciación. Los precursores T ingresan al Timo ubicándose en la zona cortical de este. A medida que los timocitos migran hacia zonas más internas de la corteza estos van avanzando en su proceso de diferenciación. En estados finales de maduración los linfocitos T pasan desde la corteza hacia la médula y finalmente salen del timo a la periferia a través de las vías linfáticas o venas. El ambiente tímico representado por las interacciones físicas que se establecen entre los timocitos y los diferentes tipos celulares que allí se encuentran (células epiteliales, dendríticas y macrófagos) y los factores solubles que son liberados al medio externo son claves en los procesos de maduración y selección. El patrón diferencial de expresión de ciertas quimioquinas y de sus receptores, en particular CXCL12, CCL17, CCL19, CCL21, CCL22 y CCL25, estaría relacionado con la migración de los timocitos a través de los diferentes subcompartimentos tímicos. Entre las diferentes citoquinas que las células estromales tímicas secretan, se ha identificado a IL-7 como un modulador directo de la sobrevida, diferenciación, transcripción y rearreglo génico del receptor de células (TCR). Además, la diferenciación de linfocitos T está sometida a un estricto control de expresión génica mediada por factores transcripcionales tales como GATA-3, E12, E47, HEB, NF-kB, Ikaros y Notch.

En base a la expresión de CD4 y/o CD8, la población de linfocitos T en un individuo adulto puede ser dividida en cuatro grupos: los linfocitos T dobles negativos

(CD4- CD8-), los dobles positivos (CD4+ CD8+) que representan poblaciones más o menos inmaduras de linfocitos T y los simples positivos (CD4+ CD8-, LT "helper" y CD4- CD8+, LT citotóxicos) que corresponden a las poblaciones más maduras de linfocitos T.

Selección tímica. En el timo ocurren dos importantes eventos de selección que son centrales en la generación del repertorio de linfocitos T maduros circulantes. Uno de estos procesos permite la generación de autotolerancia eliminando o silenciando aquellos linfocitos T que poseen una alta afinidad por antígenos propios (Selección negativa). El otro proceso de selección deriva en la generación de linfocitos T maduros con un TCR capaz de reconocer el MHC (Complejo Principal de Histocompatibilidad) propio asegurando que la respuesta inmune sea restringida por MHC (Selección positiva). Estos eventos de selección, que llevan a la producción de linfocitos T "efectivos" ocurren en el timo luego de la expresión del TCR, CD4 y CD8 y antes que estas células salgan a la periferia.

3.3. Células ILC

Las células ILC o células linfoides de la inmunidad innata (ILC: innate lymphoid cells), son morfológicamente similares a linfocitos B y linfocitos T y se desarrollan en la médula ósea, a partir de un progenitor linfoide común. Sin embargo, su desarrollo es independiente de la maquinaria de recombinación génica y, por lo tanto carece de un receptor capaz de reconocer epitopos antigénicos.

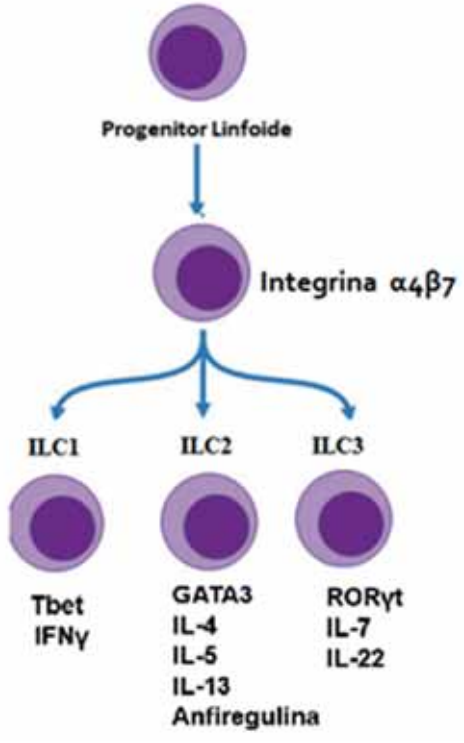


Figura 3-3. Etapas en la diferenciación de células ILC

4. LECTURAS SUGERIDAS

Bokoch, G., Chemoattractant signaling and leucocyte activation, *Blood* 86(5):1649-1660, 1995.

Bono, M.R. "Citoquinas" en Fundamentos de inmunología básica y clínica, Palomo I, Ferreira A, Rosemblatt M, Sepúlveda C. y Vergara U. (Eds). Editorial Universidad de Talca. Capítulo 10, 1998.

Dzierzak, E. "Hematopoietic stem cells and their precursors: developmental diversity and lineage relationships". *Immunological Reviews* 187:126-138, 2002.

Gérard Eberl, M. Colonna, J.P. Di Santo, A,N.J. Mckenzie. Innate Lymphoid Cells: A new paradigm in Inmmunology. Science 348(6237), 2015.

Graf, T. "Differentiation plasticity of hematopoietic cells", *Blood* 99(9): 3089-3101, 2002.

Herzog, E.L., Chai, L., and Krause, D.S. "Plasticity of marrow-derived stem cells". *Blood* 102(10): 3483-3493, 2003.

Ivanova NB, Dimos JT, Schaniel C, Hackney JA, Moore KA, Lemischka IR. "A stem cell molecular signature". *Science* 298(5593):601-604, 2002

Lee, R.; Foerter, J.; Lukeng, J.; Pareskevas, F.; Greer, J.; Rodgers, G., Editors, Wintrobe's clinical hematology, Chapters 8, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, Lippincott Willians E. Wilkins, Philadelphia, 1998.

Pereira, J., "Producción, cinética y función de los granulocitos" en Fisiología de la sangre Mezzano, D. y Pereira, J., (Eds.), capítulo 7, Editorial Universitaria, P. Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile, 1993.

Pereira J. "Estructura, producción, cinética y función de las plaquetas" en Mezzano, D., Pereira, J. Fisiología de la sangre. Mezzano D., Pereira J., (Eds.) Cap. 9, Editorial Universitaria, P. Universidad Católica, 1993.

Ramesh, A., Shivdasani, Stuart H., Orkin. "The Transcriptional Control of Hematopoiesis". *Blood* 87 (10): 4025-4033, 1996.

Robert M. "The Megacariocyte-Platelet sistem" en Clinical Hematology. Stiene-Marrin Lotspeich- Steininger Ch. Koepke J. (Eds.) 2 ed. Vol 2 chapter 55 Editorial Lippinccot, 1998.

Zon L., I. Ed., Hematopoiesis. A Developmental Approach. Oxford University Press. 2001

Capítulo

4

TROMBOPOYESIS

Andrés Trostchansky, Irene Wood, Diego Méndez, Héctor Montecino,
Eduardo Fuentes, Iván Palomo

Resumen

1. **Introducción**
2. **Células madre**
3. **Megacariocitos**
4. **Formación de plaquetas**
5. **Trombopoyetina**
6. **Trombopoyesis extramedular**
7. **Lecturas sugeridas**

RESUMEN

Las plaquetas son pequeñas células anucleadas, con un diámetro aproximado de 3 µm y forma de disco biconvexo. Las plaquetas se forman por un proceso denominado endomitosis de los megacariocitos, estimulado por la hormona trombopoyetina. La trombopoyetina se sintetiza, además del riñón e hígado, en el músculo liso y la médula ósea, mientras que se elimina a través de las mismas plaquetas aumentando la concentración de trombopoyetina circulante en condiciones de aumento de la destrucción plaquetaria. Las plaquetas participan de la primera línea de defensa durante lesiones vasculares, estados inflamatorios, infecciones, y cicatrización de heridas; en estas circunstancias se incrementa la demanda hematopoyética para producir rápidamente megacariocitos. Por lo tanto, la diferenciación rápida de una célula madre a un megacariocito es necesaria para reponer la reserva de plaquetas circulantes. La médula ósea es el sitio tradicional para la producción de plaquetas en humanos, pero estudio recientes han demostrado que hay presencia de megacariocitos en los vasos sanguíneos pulmonares, los cuales son capaces de producir y liberar plaquetas funcionales frente a ciertos estímulos.

1. INTRODUCCIÓN

La hematopoyesis en un proceso complejo que, a partir de una célula troncal, en varias etapas de maduración y diferenciación celular, da origen a glóbulos rojos, glóbulos blancos (varios tipos) y plaquetas. Este proceso esta finamente regulado por varias citoquinas y factores de maduración.

La parte de dicho proceso que se refiere a la formación de plaquetas se denomina trombopoyesis y es a lo que se refiere este capítulo.

2. CÉLULAS MADRE

Las células sanguíneas, entre las que se encuentran las plaquetas, son células diferenciadas que poseen ciclos vitales de corta duración y deben reponerse de forma constante a través de una continua proliferación celular en el organismo adulto. La célula madre, y no la célula diferenciada, es la que prolifera en el adulto. Las células madre son una fuente de células diferenciadas, ya sea manteniéndose como reservorio o dividiéndose en células hijas que se diferencian por diferentes mecanismos. Las células sanguíneas tienen un ciclo vital corto de un día a pocos meses, donde las plaquetas presentan una vida media de 7-10 días. Por lo que se producen en la médula ósea (MO) a partir de la división de una célula madre pluripotencial en diferentes vías de diferenciación; una vez completada la diferenciación dejan de proliferar. Por este motivo el mantenimiento del recuento de plaquetas depende de la proliferación continua de la célula madre pluripotencial.

3. MEGACARIOCITOS

La megacariopoyesis se define como el proceso por el cual a partir de células madre hematopoyéticas (CMH), los megacariocitos (MK) se diferencian y maduran hasta producir y liberar plaquetas a través de la endomitosis. El nombre de los MK está dado por su gran núcleo: mega (grande), cario (núcleo) cito (célula). Son células sanguíneas poliploides con un tamaño aproximado entre 20 y 100 µm. Su función biológica es producir trombocitos, los cuales participan de la hemostasia, cicatrización de heridas y angiogénesis. En los mamíferos, los trombocitos se denominan plaquetas.

Durante el proceso trombopoyético, los MK duplican su material genético y comienza el proceso mitótico, pero de una forma alterada generando células poliploides (mitosis inconclusa, con una ploidía del ADN de hasta 128 N). La célula se vuelve más grande, aumentando la cantidad y maduración del citoplasma. En este proceso hay un incremento de la síntesis proteica, y durante la maduración citoplasmática aparecen de forma progresiva varios tipos de gránulos donde se guardan esta gran cantidad de proteínas: gránulos densos, gránulos alfa y lisosomas. La visión tradicional de la megacariopoyesis describe la transformación desde las células madre hematopoyéticas a través de una serie jerárquica de células progenitoras hasta llegar a un MK maduro. Luego, el MK se somete a un proceso de maduración terminal que implica múltiples rondas de endomitosis y reestructuración citoplasmática para permitir la formación de plaquetas.

La megacariopoyesis canónica se inicia con célula madre hematopoyética pluripotencial en la MO, la cual tiene capacidad de autorrenovarse. Esta célula madre da origen a la unidad formadora de estallido de megacariocitos (BFU-MK) que se diferencia y produce unidades formadoras de colonias de megacariocitos (CFU-MK) que son capaces de sufrir rondas extensas de divisiones mitóticas en respuesta a factores mitógenos. Las CFU-MK originan a los megacarioblastos que se caracterizan por tener un solo núcleo ovalado y un citoplasma basófilo no granular. Continuando con la maduración, se genera el promegacariocito que posee de dos a cuatro núcleos, con un citoplasma basófilo y gránulos azurofílicos. El promegacariocito madura para producir megacariocitos, los cuales aumentan considerablemente su volumen citoplasmático. La maduración completa de los megacariocitos demora aproximadamente 10 días, para posteriormente producir proplaquetas que finalmente liberan plaquetas a la circulación (Figura 4-1).

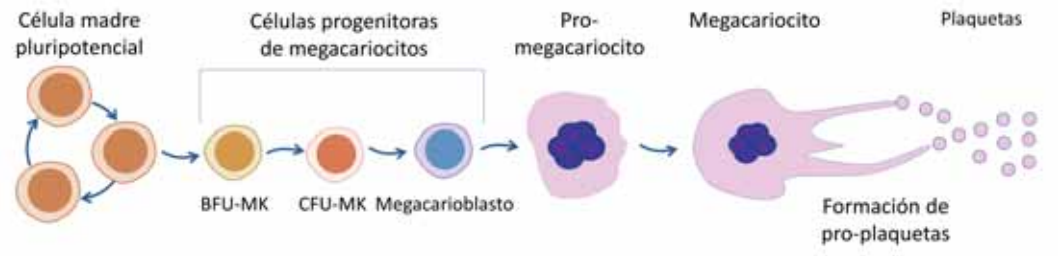


Figura 4-1. Megacariopoyesis y biogénesis plaquetaria. Las células madre pluripotenciales proliferan y se diferencian para producir progenitores de MK, los cuales se diferencian para convertirse en MK inmaduros (megacarioblastos y promegacariocitos), los cuales posteriormente maduran para originar MK que producen proplaquetas que liberan plaquetas.

Actualmente esta visión canónica se encuentra en revisión, mediante de la redefinición de esta jerarquía y postulando rutas alternativas por las cuales las células madre hematopoyéticas se diferencian en MK. En particular, se ha redefinido el origen de los MK, incluida la existencia y jerarquía de los progenitores de MK. Estudios recientes sugieren que las células madre hematopoyéticas se originan como preparadas para MK y pueden eludir los puntos de control de linaje tradicionales. En general, se está volviendo evidente que la megacariopoyesis no solo ocurre como un proceso escalonado, sino que es dinámica y se adapta a las necesidades biológicas. Debido a que las plaquetas son la primera línea de defensa en la lesión vascular y también actúan en procesos inflamatorios, infecciosos y la cicatrización de heridas, es común que se produzca un consumo de las plaquetas circulantes durante estos procesos, lo cual estimula la diferenciación rápida de las células madre hematopoyéticas a MK en la MO, para restaurar el recuento normal de plaquetas circulantes.

El estudio de la megacariopoyesis humana se ha visto obstaculizado por la relativa escasez de MK y unidades formadoras de colonias megacariocíticas en la MO. El descubrimiento en 1992 del receptor de trombopoyetina, llamado Mpl seguido de la trombopoyetina (TPO) en 1994, han ayudado a la elucidación del mecanismo y componentes moleculares involucrados en el proceso de trombopoyesis. La trombopoyesis es el proceso mediante el cual se generan las plaquetas en el último paso de la maduración del MK.

4. FORMACIÓN DE PLAQUETAS

Se han propuesto al menos dos modelos para explicar la formación de plaquetas. Utilizando estudios de microscopía, James Homer Wright propuso que las plaquetas se liberan de procesos pseudopodiales (luego denominados proplaquetas) que se extienden desde los MK hacia los vasos sanguíneos. De forma alternativa, Sharnoff y sus colegas sugirieron que los MK viajan a través de la circulación hasta los pulmones donde se fragmentan dando lugar a la producción de plaquetas dentro de los capilares pulmonares. En el modelo de

Wright se hipotetiza que el sistema de demarcación de membrana (DMS) actúa como un depósito de membrana que apoya la formación de proplaquetas, mientras que, en el modelo alternativo, el DMS define territorios plaquetarios preformados.

El proceso se da en dos pasos: formación de proplaquetas y liberación de las plaquetas directamente al torrente sanguíneo. La trombopoyesis se desarrolla en el nicho vascular de la MO, donde el microambiente de los sinusoides (citoquinas, factores de crecimiento de células madres, etc.) favorece la producción de plaquetas. El MK sufre modificaciones físicas durante la interacción con el endotelio de los sinusoides, formando prolongaciones del citoplasma de 2-4 µm de diámetro denominadas proplaquetas. Los microtúbulos son esenciales para la formación de proplaquetas, el transporte de gránulos y organelos, ya que defectos en su ensamblaje conducen a la ausencia de generación de proplaquetas y por ende trombocitopenia. A medida que maduran, los MK adquieren competencia para la formación de plaquetas a través de la modulación ascendente de una amplia gama de proteínas reguladoras del citoesqueleto, la membrana y los gránulos, diferenciándose en células que son grandes, poliploides y tienen un citoplasma lleno de un complejo sistema de interconexiones de membranas citoplasmáticas, así como depósitos de ribosomas, gránulos alfa y gránulos densos. Durante la producción de plaquetas se expresan receptores transmembrana altamente regulados en su superficie, donde se destacan las glucoproteínas de la familia de las integrinas (GP), las cuales están implicadas a lo largo de todo el proceso de activación plaquetaria, específicamente durante la adhesión y agregación, además de promover el desarrollo de trombos mediante interacciones receptor-ligando.

Una vez que se forman las proplaquetas en los sinusoides vasculares de la MO, mediante el estímulo mecánico que ejerce el flujo sanguíneo sobre las proplaquetas, se liberan las plaquetas individuales a un promedio de 200-5000 nuevas plaquetas/megacariocito (Figura 4-2). Se ha propuesto un modelo alternativo de trombopoyesis en condiciones pro-inflamatorias, donde se requiere de un aumento del número de plaquetas en sangre en poco tiempo. Se le denomina teoría de la fragmentación explosiva, y postula la presencia de ondulaciones, protrusiones y formas similares a ampollas con presencia de zonas con membranas internas en el citoplasma que demarcan plaquetas preformadas que se liberan cuando se fracciona el citoplasma.

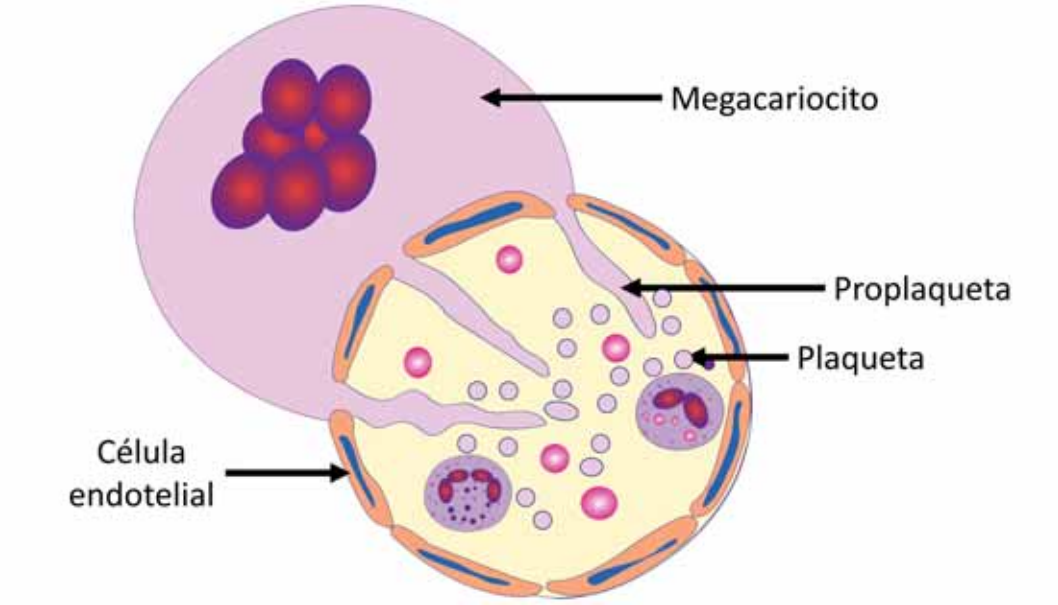


Figura 4-2. Esquema de formación de plaquetas a partir de megacariocitos en los sinusoides vasculares de la médula ósea. Tomado/adaptado de ("El megacariocito: una célula muy original. Adriana González-Villalva, Patricia Bizarro-Nevares, Marcela Rojas-Lemus, Nelly López-Valdez, Martha Ustarroz-Canoa, Fernanda Barbosa-Barrón, Brenda García-Gila, Juan Carlos Albarrán-Alonso, Teresa I. Fortoul van der Goes. Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM Vol. 62, N° 1, Enero-Febrero 2019).

5. TROMBOPOYETINA

La TPO es el principal factor regulador de la megacariopoyesis. Actúa en todas las fases evolutivas de forma positiva, directa, sinérgica y aditiva con otros factores hematopoyéticos. Interviene en la fase madurativa incluyendo la poliploidización y la diferenciación terminal con formación de proplaquetas. Se la considera como el principal regulador fisiológico de la maduración megacariocítica y de la producción plaquetaria. El término eritropoyetina (EPO) se utilizó por primera vez en la literatura en 1906 para describir la sustancia humoral responsable para la eritropoyesis. A comienzos del siglo XX, las plaquetas sanguíneas eran apenas distinguibles en los mejores microscopios, lo que llevó a la denominación peyorativa de las plaquetas como "el polvo de la sangre". Los trabajos pioneros de Carnot y de Wright y colaboradores a principios del siglo XX definieron el papel crítico de las plaquetas en la coagulación sanguínea y su origen en el MK medular, lo que finalmente llevó a Kelemen y Tanos (1958) a acuñar el término trombopoyetina para describir la sustancia humoral responsable de la producción de plaquetas.

La TPO humana es un polipéptido de 353 aminoácidos que incluye la secuencia líder secretora de 21 aminoácidos. La proteína madura consta de dos dominios. El dominio de 154 residuos amino-terminal es homólogo a EPO y

se une al receptor c-MPL. Si bien este dominio de la TPO es homólogo a EPO, las dos proteínas no compiten entre sí por unirse a los receptores correspondientes. El dominio carboxilo-terminal de TPO es responsable de aumentar la vida media circulatoria de la hormona y actúa como chaperona intramolecular, ayudando al plegamiento apropiado del polipéptido en la hormona madura.

La TPO regula predominantemente la diferenciación de MK de las células madre, y por lo tanto todas las células progenitoras preparadas para convertirse en MK expresan el receptor c-MPL. Esta regulación es el resultado de un circuito de retroalimentación; la TPO es constitutivamente producido por el hígado y en menor medida por el riñón, para luego circular en plasma, donde es secuestrada por las plaquetas circulantes en un modo c-MPL-dependiente. La regulación de los niveles de TPO en el plasma depende completamente del número de plaquetas; en pacientes con trombocitosis, la síntesis de TPO en estado estacionario se ve sobrepasada por el metabolismo de la TPO mediado por las plaquetas circulantes llevando a bajos niveles de la hormona. Por el contrario, en pacientes con trombocitopenia, una pequeña parte de la producción de TPO hepática es absorbida por las plaquetas, lo que permite que los niveles sanguíneos aumenten (Figura 4-3).

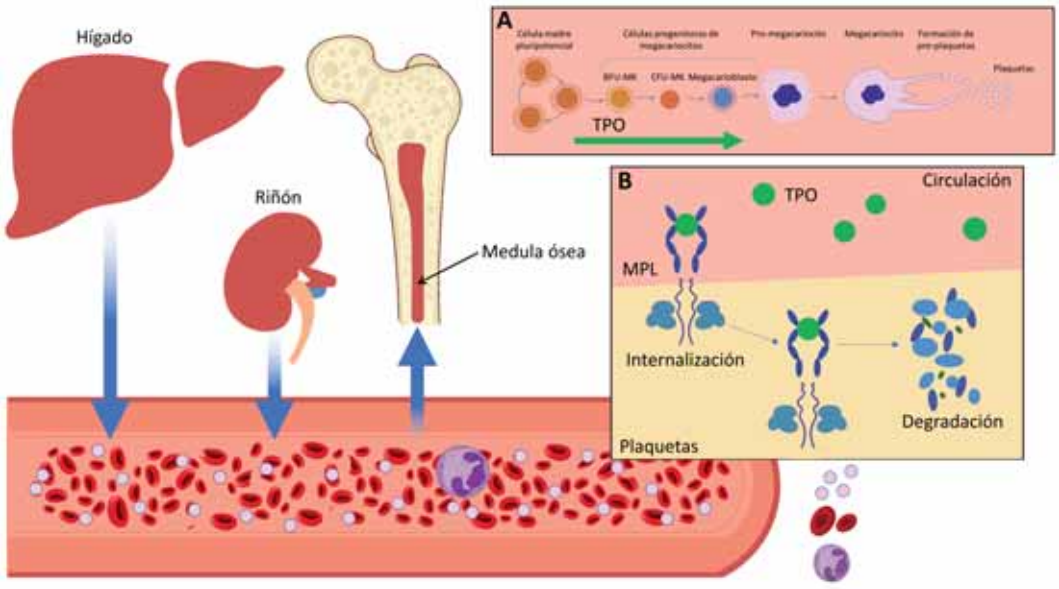


Figura 4-3 Producción y regulación de la Trombopoyetina. (A) La TPO se produce en su mayoría en el hígado y en menor grado en el riñón. Cuando se libera a la circulación sanguínea, induce la diferenciación de MK en la MO, provocando un aumento de las plaquetas circulantes. (B) La regulación de los niveles de TPO circulantes depende de su unión al c-MPL en las plaquetas, las cuales internalizan y degradan el complejo hormona-receptor. Este mecanismo permite que las plaquetas circulantes influyan directamente en la megacariopoyesis y la producción de nuevas plaquetas en la MO. HSC (célula madre hematopoyética), CMP (progenitor mieloide común), MEP (progenitor de eritrocitos de megacariocitos), MKB (megacarioblastos), MK (megacariocitos), PLT (plaquetas). Tomado/adaptado de "The thrombopoietin receptor: revisiting the master regulator of platelet production" Hitchcock, Platelets Journal, 2021.

Distintos estados inflamatorios se asocian con niveles de TPO por encima de lo esperado en relación al recuento de plaquetas, aunque este hallazgo no ha sido universal. A modo de ejemplo, la IL-6 es una de las citoquinas que llevan al aumento de la producción de TPO en hepatocitos inducido por la inflamación. Estados inflamatorios provocados por enfermedades autoinmunes como colitis ulcerosa y artritis reumatoide están asociados a trombocitosis y el aumento de los niveles de TPO.

La reducción del recuento plaquetario conduce a un aumento de los niveles de TPO circulante que es libre de estimular las células madre hematopoyéticas de la MO, aumentando el número de MK, y por ende de plaquetas. La señalización por TPO da como resultado la internalización del ligando del complejo receptor c-mpl-TPO iniciando diferentes cascadas de transducción de señales entre las que se incluyen JAK2, STAT3 / STAT5, MAPK / ERK. Específicamente, la TPO induce la fosforilación de JAK2 quien fosforila los blancos de la cascada rio abajo, incluida la activación de los factores de transcripción STAT3 / STAT5. La señalización a través de estas vías provoca la activación de factores de transcripción específicos de MK y la regulación de expresión de genes específicos de MK como PI3K / AKT.

Los seres humanos que carecen del receptor c-Mpl funcional tienen un recuento medio de plaquetas de 21 × 10^9/L o menos. Estos niveles sugieren que aquellos pacientes que no contienen una señalización funcional de TPO, presentan una producción de plaquetas independiente de la señalización y acción de la TPO sobre la megacariopoyesis. Aunque la TPO es un factor crítico regulador de la megacariopoyesis, los estudios recientes sugieren que no tiene un efecto esencial en las etapas finales de la formación y liberación de proplaquetas. Aunque la producción residual de plaquetas persiste en ausencia de la señalización de TPO, quienes son los reguladores de la megacariopoyesis independientes de TPO aún no han sido totalmente determinados. Algunas vías alternativas que mejoran este proceso involucran la familia de las interleucinas (IL). Se descubrió que esta familia influía en la megacariopoyesis antes del descubrimiento de la TPO. Sin embargo, estas citoquinas estaban asociadas con un aumento de TPO en plasma, lo que sugiere que las IL regulan al alza la producción de TPO, en lugar de estimular directamente la megacariopoyesis.

6. TROMBOPOYESIS EXTRAMEDULAR

La MO es el sitio tradicional para la producción de plaquetas en humanos, aunque la evidencia actual muestra que los pulmones son sitios donde se puede llevar a cabo la trombopoyesis, debido a que existe presencia de MK en los vasos pulmonares y que el tejido pulmonar es un sitio donde las plaquetas se pueden liberar en respuesta a ciertos estímulos. Además, los eventos centrales en la trombopoyesis están dirigidos por mecanismos autónomos de la célula y no requieren el entorno específico de la MO.

Se ha descrito que MK y proplaquetas pueden cruzar la barrera endotelial de la membrana parasinusoidal y llegan a la circulación desde la MO y el bazo, para

luego quedar atrapados en la microvasculatura pulmonar principalmente debido a su diámetro y rigidez de citoesqueleto. Esta retención en la circulación pulmonar proporciona un nivel óptimo de tensión de cizallamiento e interacciones moleculares entre los capilares pulmonares (ricos en vWF) y los MK, lo cual favorece la generación eficiente de plaquetas. Con el desarrollo de la microscopía intravital, se demostró la primera evidencia directa de que la liberación de plaquetas puede ocurrir fisiológicamente en el pulmón, debido a que MK humanos inyectados en ratones quedaron atrapados transitoriamente en los pulmones y liberaron una ola de plaquetas, demostrando que la retención de MK es potencialmente un mecanismo de formación de plaquetas en el pulmón (Figura 4.4).

Un dato relevante es que la sangre que ingresa al pulmón está enriquecida en MK y que la sangre de salida tiene casi nula presencia de MK, pero está enriquecida en plaquetas. Además, el tratamiento con TPO aumenta el recuento de plaquetas en sangre periférica y se asocia con un mayor número de MK y proplaquetas en los lechos vasculares pulmonares, lo cual fue observado mediante microscopía electrónica y microscopía intravital.

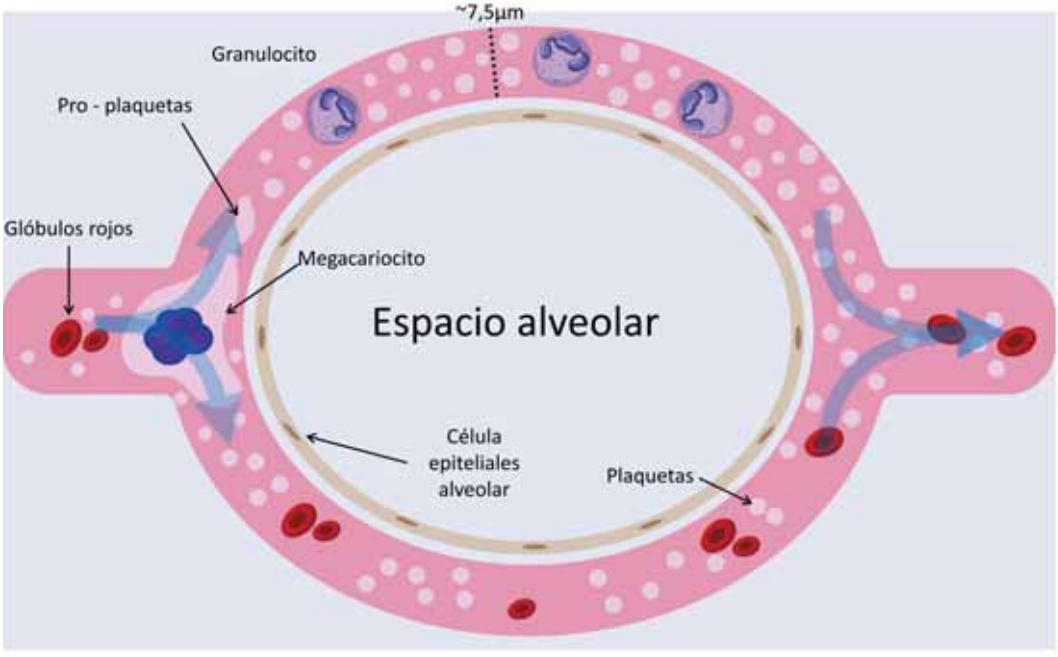


Figura 4.4 Retención de Megacariocitos y liberación de plaquetas en los pulmones. La mayoría de los MK que llegan a los pulmones son retenidos en los capilares y arteriolas por su gran tamaño y rigidez de su citoesqueleto. Allí pueden generar plaquetas a partir de extensiones de proplaquetas y proplaquetas liberadoras de plaquetas.

Existen dos poblaciones de MK descritas en pulmón: MK intravasculares productores de plaquetas en el pulmón y MK residentes del pulmón. Los MK residentes son más pequeños e inmaduros, los cuales no se ha observado que liberen proplaquetas y plaquetas de forma activa. Es probable que estas células estén asociadas a procesos de inmunidad innata, inflamación y el reconocimiento de patógenos en comparación con los MK de la MO. Aunque es probable que estos MK residentes mantengan la capacidad de producir plaquetas, son capaces de procesar y presentar antígenos que activan los linfocitos CD4+, lo cual sugiere que podrían ser las primeras células en responder a los patógenos y tienen un papel importante en los procesos inmunitarios más allá de la producción de plaquetas.

7. LECTURAS SUGERIDAS

Jurk K, Kehrel BE. Platelets: physiology and biochemistry. Semin Thromb Hemost 2005;31:381-392.

Broudy, V.C., Lin, N.L., Sabath, D.F., Papayannopoulou,T. & Kaushansky, K. (1997) Human platelets display high-affinity receptors for thrombopoietin. Blood, 89, 1896–1904.

Bruno, L., Hoffmann, R., McBlane,F., Brown, J., Gupta, R., Joshi, C., Pearson, S., Seidl, T., Heyworth, C., and Enver, T. “Molecular signatures of self-renewal, differentiation, and lineage choice in multipotential hemopoietic progenitor cells in vitro”. Mol. Cell. Biol. 24(2): 741-756, 2004.

Cerutti, A., Custodi, P., Duranti, M., Noris, P. & Balduini, C.L. (1997) Thrombopoietin levels in patients with primary and reactive thrombocytosis. British Journal of Haematology, 99, 281–284.

Cytokines on the web. COPE cytokines online Pathfinder Encyclopaedia. "http://www.copewhitcytokines.de

Deficiencia de plaquetas: trombocitopenia. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/hih/voll2_2_99/

Dzierzak, E. “Hematopoietic stem cells and their precursors: developmental diversity and lineage relationships”. Immunological Reviews 187:126-138, 2002.

Expresión selectiva del receptor para trombopoyetina en tejidos humanos. Disponible en: "http://www.staf.org/tto/beatesopanol"

Gómez-Gómez B., Rodríguez-Weber F.L., Díaz-Greene E.D. Platelet physiology, platelet aggregometry and their clinical usefulness. Med Int Méx. 2018 March;34(2):244-263.

González-Villalva A., Bizarro-Nevares P., Rojas-Lemus M., López-Valdez N., Ustarroz-Canoa M, Barbosa-Barrón F., García-Gila B., Albarrán-Alonso J.C., Fortoul van der Goes T.I.. El megacariocito: una célula muy original. Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM Vol. 62, N° 1, Enero-Febrero 2019

Goodman & Gilman, Las bases farmacológicas de la terapéutica Edition 13 McGraw-Hill Interamericana, 2019.

Graf, T. "Differentiation plasticity of hematopoietic cells", Blood 99(9): 3089-3101, 2002.

Herzog, E.L., Chai, L., and Krause, D.S. "Plasticity of marrow-derived stem cells". Blood 102(10): 3483-3493, 2003.

Hitchcock, I.S. and Kaushansky, Kenneth. Thrombopoietin from beginning to end. British Journal of Haematology, 165: 259–268, 2014.

Ivanova NB, Dimos JT, Schaniel C, Hackney JA, Moore KA, Lemischka IR. "A stem cell molecular signature". Science 298(5593):601-604, 2002.

Jurk K, Kehrel BE. Platelets: physiology and biochemistry. Semin Thromb Hemost 2005;31:381-392.

Kaushansky, K. (1998) Thrombopoietin. New England Journal of Medicine, 339, 746–754.

Kaushansky, K., Broudy, V.C., Lin, N., Jorgensen, M.J., McCarty, J., Fox, N., Zucker-Franklin, D. & Lofton-Day, C. (1995) Thrombopoietin, the Mp1 ligand, is essential for full megakaryocyte development. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 92, 3234–3238.

Kelemen, E., Cserhati, I. & Tanos, B. (1958) Demonstration and some properties of human thrombopoietin in thrombocythemic sera. Acta Haematologica, 20, 350–355.

Lemischka, IR. "Microenviromental regulation of hematopoietic stem cells". Stem Cells 1:63-68, 1997.

Noetzli, L.J., French, S.L., Machlus, K.R. (2019) New Insights Into the Differentiation of Megakaryocytes From Hematopoietic Progenitors. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 39:1288- 1300.

Parise L., Boudignon-Proudhon C., Keely P., Naik U. 2Platelets in hemostasis and thrombosis" en Wintrobes Clinical Hematology. Lee R., Foerter J., Lekens J. (Eds.) 10 ed. Vol. 1, chapter 23, Editorial Lippinccot Williams y Wilkins, 1999.

Payne, K.L., and Crooks, G.M. “Human hematopoietic lineage commitment”. Immunological Reviews 187: 9-11, 2002.

Robert M. “The Megacariocyte-Platelet sistem” en Clinical Hematology. Stiene- Marrin Lotspeich- Steininger Ch. Koepke J. (Eds.) 2 ed. Vol 2 chapter 55 Editorial Lippinccot, 1998.

Romanelli, G., et. al. Megacariopoyesis humana in vitro: determinación de la concentración óptima de trombopoyetina. An Facultad Med (Univ Repúb 25 Urug). 2019; 6(2):25-34.

Shivdasani, R.A., and Orkin, S.H. “The transcriptional control of hematopoyesis”. Blood 87(10): 4025-4039, 1996.

Zon L., I. Ed., Hematopoiesis. A Developmental Approach. Oxford University Press. 2001.

Yu M, Cantor AB. Megakaryopoiesis and thrombopoiesis: an update on cytokines and lineage surface markers. Methods in molecular biology. 2012;788:291-303.

Kaushansky K. Thrombopoiesis. Seminars in hematology. 2015;52(1):4-11.

Sugimoto N, Eto K. Platelet production from induced pluripotent stem cells. Journal of thrombosis and haemostasis: JTH. 2017;15(9):1717-27.

Weyrich AS, Zimmerman GA. Platelets in lung biology. Annual review of physiology. 2013;75:569-91.

Boilard E, Machlus KR. Location is everything when it comes to megakaryocyte function. The Journal of clinical investigation. 2021;131(1).

Hitchcock IS, Hafer M, Sangkhae V, Tucker JA. The thrombopoietin receptor: revisiting the master regulator of platelet production. Platelets. 2021;32(6):770-8.

Ouzegdouh Y, Capron C, Bauer T, Puymirat E, Diehl JL, Martin JF, et al. The physical and cellular conditions of the human pulmonary circulation enable thrombopoiesis. Experimental hematology. 2018;63:22-7 e3.

Lefrancais E, Looney MR. Platelet Biogenesis in the Lung Circulation. Physiology. 2019;34(6):392-401.

SECCIÓN 1.2 **SERIE ROJA**

Capítulo 5. Membrana de Glóbulos Rojos

Capítulo 6. Metabolismo no hierro de Glóbulos Rojos

Capítulo 7. Hemoglobina

Capítulo 8. Metabolismo del hierro

Capítulo

5

MEMBRANA DE LOS GLÓBULOS ROJOS

Luis Guzmán, Eduardo Fuentes, Iván Palomo

Resumen

1. Introducción

2. Glóbulos rojos
2.1. Estructura de los glóbulos rojos

3. Membrana de los glóbulos rojos
3.1 Lípidos de Membrana
3.2. Proteínas de membrana

4. Organización de la membrana eritrocitaria
4.1. Citoesqueleto de la Membrana Eritrocitaria
4.2. Unión del Citoesqueleto a la Membrana Eritrocitaria
4.3. Transportadores de Membrana Eritrocitaria

5. Lecturas sugeridas

RESUMEN

Los glóbulos rojos tienen por principal función el transporte de oxígeno y funciones menores como la regulación del flujo sanguíneo local y el transporte de dióxido de carbono, su membrana encierra el citoplasma que carece de núcleo y orgánulos, y posee hemoglobina como principal componente.

La membrana de los glóbulos rojos es una bicapa lipídica, estabilizada con colesterol, en la que se entrelazan alrededor de 20 proteínas principales y al menos 850 secundarias. Esta bicapa estabiliza las proteínas de membrana (que forman el citoesqueleto de la membrana), mantiene la forma y flexibilidad de la célula y proporciona canales de intercambio iónico.

1. INTRODUCCIÓN

Los glóbulos rojos humanos miden aproximadamente 8 µm de diámetro y 2 µm de espesor, su forma de discocito les proporciona una disminución de la energía de flexión de la membrana y un aumento del área superficial en comparación con una forma esférica, siendo su función principal la captación de oxígeno de los pulmones y su suministro a los tejidos.

La membrana de los glóbulos rojos es una bicapa lipídica compuesta por 50% de proteínas, 40% de lípidos y 10% de carbohidratos, en este capítulo se analizarán los principales componentes de esa membrana, principalmente las proteínas integrales de la membrana las cuales están organizadas en complejos macromoleculares centrados en la banda 3, además del citoesqueleto de la membrana, una red de proteínas de 40 a 90 nm de espesor que lamina la superficie de la membrana interna, compuesto principalmente por espectrina, actina y sus proteínas asociadas (tropomiosina, tropomodulina, aducina y dematina), proteína 4.1R y anquirina.

2. GLÓBULOS ROJOS

El glóbulo rojo humano o eritrocito, en su estado maduro ha pasado la etapa de reticulocitos, ha perdido no solo su núcleo, sino también orgánulos como las mitocondrias, el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico con sus ribosomas, y ha asumido la forma de un disco bicóncavo (discocito). Esta forma disciforme proporciona una gran superficie para el intercambio de oxígeno, a su vez, la falta de orgánulos permite que el glóbulo rojo sea flexible y pueda deformarse fácilmente para pasar a través de capilares y sinusoides esplénicos.

Los glóbulos rojos humanos miden aproximadamente 8 µm de diámetro y 2 µm de espesor, su forma de discocito da como resultado una disminución de la energía de flexión de la membrana y un aumento del área superficial en

comparación con una forma esférica (Figura 5-1), lo que es ventajoso por su deformabilidad por capilaridad y una mayor capacidad de transferencia de gases. La alteración de la forma bicóncava típica de los eritrocitos puede ocurrir en función de su entorno (tratamiento químico o físico) o en estados patológicos (enfermedad o envejecimiento), en términos generales, la morfología de los glóbulos rojos es el resultado de condiciones físico-químicas específicas que la célula ha experimentado.

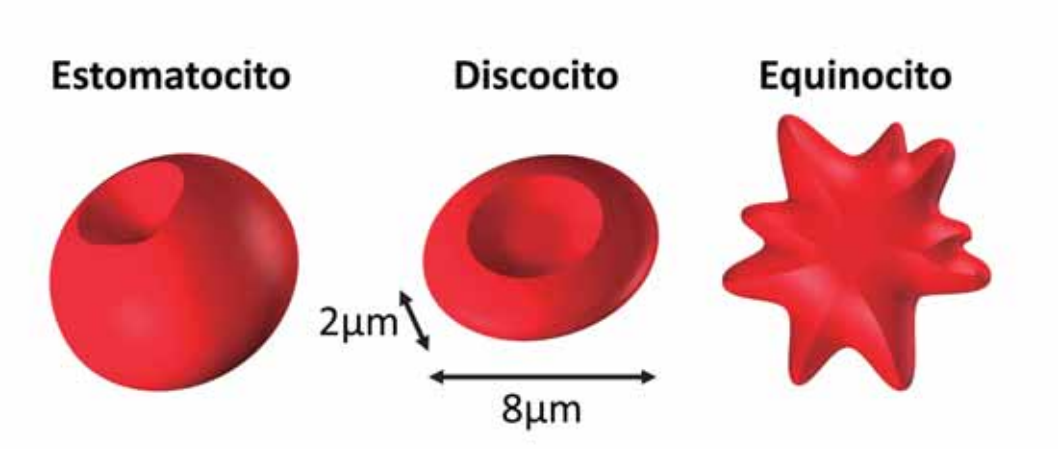


Figura 5-1. Representaciones esquemáticas de glóbulos rojos en diferentes formas. El discocito es la forma óptima de glóbulos rojos para la fisiología.

Estas células desempeñan muchas funciones biológicas importantes, siendo su función principal la captación de oxígeno desde los pulmones y su suministro a los tejidos, mediante la oxigenación de los iones ferrosos (Fe^{2+}) del grupo hemo; alrededor del 98% del transporte de oxígeno se realiza a través de los glóbulos rojos, y solo el 2% se transporta en el plasma. El glóbulo rojo también es capaz de transportar dióxido de carbono desde la periferia a los pulmones, uniendo dióxido de carbono, como carbamato, al extremo N-terminal de la cadena de α-globina, con su posterior liberación como dióxido de carbono en los pulmones. Sin embargo, el glóbulo rojo solo es responsable de transportar alrededor del 15% del dióxido de carbono, el resto se transporta en el plasma.

2.1. Estructura de los glóbulos rojos

La estructura del glóbulo rojo refleja su función, una membrana celular encierra el citoplasma que tiene la hemoglobina como componente principal, y la anhidrasa carbónica es la segunda proteína más abundante. La membrana está compuesta por una bicapa lipídica a través de la cual pasan diversas proteínas con distintas funciones que incluyen el transporte de aniones, agua y glucosa; además la bicapa lipídica se une en varios puntos al citoesqueleto subyacente, manteniendo así la forma celular. Al final de la vida útil de los eritrocitos (apro-

ximadamente 120 días), la senescencia de los glóbulos rojos es el resultado de un cambio conformacional en una proteína de membrana, banda 3, que lleva a la aparición de un antígeno específico de senescencia reconocido por la inmunoglobulina G (IgG) autóloga, que marca las células para su eliminación por los macrófagos. A su vez, los glóbulos rojos envejecidos también son más susceptibles al estrés oxidativo y, por tanto, a la eriptosis. En este proceso, hay externalización de la fosfatidilserina de la membrana que conduce a la unión a CD36, el receptor de fosfatidilserina en los macrófagos, con la fagocitosis resultante.

Para la obtención de energía dependen de la respiración anaeróbica a través de la vía glucolítica para obtener trifosfato de adenosina (ATP) y la producción de poder reductor como dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADH). Además, el poder reductor transmitido como nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) se produce a través de la vía de las pentosas fosfato. Estas fuentes de energía son suficientes para mantener: la membrana de los eritrocitos en un estado flexible y funcional, el medio interno y la hemoglobina en forma ferrosa reducida (que puede combinar reversiblemente con oxígeno).

3. MEMBRANA DE LOS GLÓBULOS ROJOS

La membrana de los eritrocitos es una bicapa de fosfolípidos, estabilizada con colesterol, en la que se entrelazan proteínas de membrana y glicoproteínas. Esta bicapa estabiliza las proteínas de membrana (que forman el citoesqueleto de la membrana), mantiene la forma y flexibilidad de la célula y proporciona canales de intercambio iónico (Figura 5-2).

Los dominios externos de las proteínas transmembrana y de superficie están altamente glicosilados y explican la carga negativa en los glóbulos rojos como ácido siálico y las glicoproteínas de los grupos sanguíneo. Las proteínas pueden tener un dominio transmembrana integral o pueden estar unidas a un ancla de fosfatidilinositol glicano antes de la translocación a la membrana durante la formación de glóbulos rojos. Una mutación somática adquirida en las células madre hematopoyéticas puede provocar una falla en la producción del anclaje fosfatidilinositol glicano, lo que conduce a la pérdida de varias proteínas de superficie y a la producción de glóbulos rojos con marcada susceptibilidad a la lisis por complemento (hemoglobinuria paroxística nocturna).

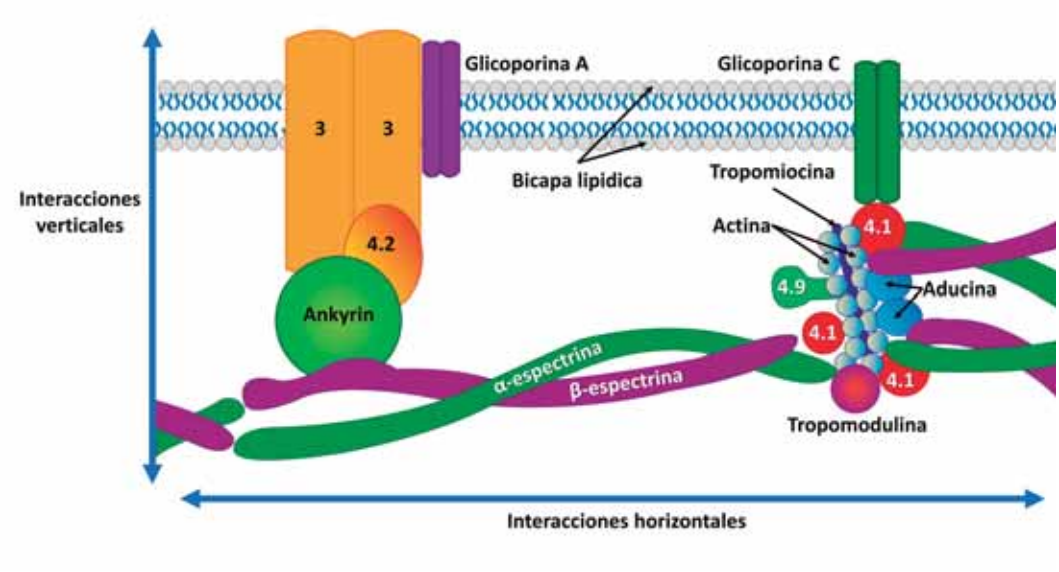


Figura 5-2. Membrana de los glóbulos rojos. La espectrina interactúa con otras proteínas, algunas de las cuales son proteínas transmembrana, y con la bicapa lipídica. Los oligosacáridos en los dominios citoplásmicos de las proteínas determinan varios antígenos de grupos sanguíneos. Algunas proteínas del citoesqueleto se identifican mediante números que corresponden a su posición en la electroforesis.

3.1 Lípidos de Membrana

Los principales lípidos de membrana que están presentes en los glóbulos rojos son: fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), esfingomielina (SM) y colesterol. La distribución de estos lípidos entre las valvas de la bicapa lipídica en la membrana en los glóbulos rojos humanos normales, posiciona a la mayoría de los lípidos SM y PC en la valva exterior, mientras que algo de PC y gran parte de la PE se encuentran en la valva interior. Hay aproximadamente 3×10^8 moléculas de fosfolípidos y 1×10^8 de colesterol por eritrocito. La enzima flipasa (ATP8A2 / TMEM30A) mueve los fosfolípidos del exterior al interior de la membrana, mientras que la enzima flopasa (Transportador ABC) mueve los fosfolípidos en la dirección opuesta, ambas enzimas utilizan ATP. Las escramblasas (PLSCR) son independientes del ATP y mueven los fosfolípidos en ambas direcciones.

Se piensa que el colesterol se mueve sin ayuda entre las dos bicapas en menos de un segundo. Los movimientos laterales de los análogos de fosfolípidos en el plano (valva) de la membrana ocurren en menos de 1 µm / s, mientras que la transferencia de fosfolípidos a través de la bicapa se mide en minutos a días. El número de moléculas de escramblasa se estima en 764 / célula; mientras que se desconocen los números de las otras dos enzimas. Cabe señalar que la distribución de diferentes lípidos parece estar asociada con diferentes partes de la superficie de la membrana.

3.2. Proteínas de membrana

La membrana de los glóbulos rojos contiene alrededor de 20 proteínas principales y al menos 850 secundarias. Las proteínas integrales de la membrana están organizadas en complejos macromoleculares centrados en la banda 3, el canal de intercambio aniónico. La mayoría de las proteínas de la membrana periférica forman el esqueleto de la membrana, una red de proteínas de 40 a 90 nm de espesor que lamina la superficie de la membrana interna (Tabla 5-1). El esqueleto está compuesto principalmente por espectrina, actina y sus proteínas asociadas (tropomiosina, tropomodulina, aducina y dematina), proteína 4.1R y anquirina.

Alguna de las principales proteínas encontradas en glóbulos rojos se mencionan a continuación:

Espectrina: La espectrina de eritrocitos es una proteína larga y flexible, compuesta por 2 cadenas paralelas (espectrina α y β) orientadas en direcciones opuestas. Cada cadena contiene múltiples repeticiones de tipo espectrina, con dominios funcionales especializados en el extremo de la "cabeza" para la asociación de dímero-tetrámero de espectrina y para la unión de anquirina eritrocitaria (también conocida como anquirina-1 o anquirina-R), y dominios en la "cola" final para unirse a la proteína 4.1R, proteína 4.2, filamentos cortos de actina y otras proteínas. En promedio, se unen 6 espectrinas por filamento de actina, lo que da lugar a una disposición pseudohexagonal.

Actina: Los glóbulos rojos contienen filamentos cortos de doble hélice de no músculo o β-actina, denominados F-actina o "protofilamentos". La participación de F-actina en el complejo de unión del citoesqueleto de la membrana es importante, ya que la proporción de actina polimerizada a despolimerizada controla la flexibilidad de la membrana, que aumenta cuando se inhibe la polimerización de actina. Estos se encuentran aproximadamente paralelos al plano de la membrana (±20°) y están orientados aleatoriamente. Hay cerca de 30.000 a 40.000 protofilamentos por eritrocito, con 6 a 8 monómeros de actina en cada una de las 2 hebras.

Banda 3: La banda de eritrocitos 3, u oficialmente SLC4A1, es la principal proteína de la membrana de los glóbulos rojos, con alrededor de 1,2 millones de copias por célula. Funcionalmente, son 2 proteínas: (1) un dominio N-terminal citoplasmático de la membrana periférica que es un sitio de unión clave para el esqueleto de la membrana, enzimas glucolíticas y desoxihemoglobina; y (2) una proteína de membrana integral (C-terminal) que forma el canal de intercambio aniónico de los glóbulos rojos y ayuda al transporte de dióxido de carbono.

Proteína 4.1R: La proteína 4.1R promueve la unión de espectrina-actina y ayuda a unir el esqueleto de la membrana a la membrana; la primera de estas funciones es especialmente importante. En condiciones fisiológicas, la espectrina de eritrocitos se une muy débilmente a la actina. La proteína 4.1R se une tanto a la

espectrina como a la actina y genera un complejo ternario de alta afinidad. La actividad del cofactor está contenida en un dominio de unión de espectrina-actina (SABD) de 10 kDa en el medio de la molécula. El sitio de unión a la actina en el SABD está dividido en dos partes por un sitio de unión a la espectrina en un único péptido lineal. El otro dominio 4.1R importante es el dominio de unión a la membrana globular N-terminal. Se une a la glucoforina C, la proteína p55, la banda 3 y la calmodulina en áreas separadas y bien definidas.

Tropomiosina: La tropomiosina (TM) de eritrocitos es un dímero largo en forma de varilla de isoformas α- y γ-TM (hTM5b y hTM5, respectivamente). Un dímero de TM se une a cada una de las 2 hebras del protofilamento de actina, unión que depende del ion magnesio; las isoformas de TM de los glóbulos rojos también se unen a la tropomodulina. La TM de células rojas es lo suficientemente larga (cerca de 34 nm) para cubrir los 7 monómeros de actina estimados en 1 hebra del protofilamento de actina, lo que respalda la idea de que la TM sirve como una regla molecular (junto con las proteínas que cubren la actina) en ensamblar y fortalecer el filamento después del ensamblaje.

Aducina: La aducina es una proteína multifuncional compleja que contiene una subunidad α y una subunidad β o, con menos frecuencia, una subunidad γ relacionada. Las subunidades de aducina contienen un dominio de cabeza globular y una cola extendida y flexible. La forma predominante es probablemente el heterodímero αβ, con alrededor de 30.000 copias del dímero por eritrocito. La aducina ayuda a unir el esqueleto de la membrana a la bicapa lipídica a través de interacciones con el canal de intercambio aniónico (banda 3) y el transportador de glucosa tipo 1. El sitio de unión de la banda 3 se encuentra en las colas de la aducina α y β. Se desconoce si la aducina se une a los dímeros o tetrámeros de la banda 3 y si se une a 1 o 2 de cada uno.

Tropomodulina 1: La tropomodulina 1 (TMod1) tiene 2 funciones: cubre el extremo puntiagudo o de crecimiento lento de los filamentos de actina y se une a la TM, lo que refuerza en gran medida la protección de la actina. Hay cerca de 30.000 copias por glóbulo rojo, o 1 por protofilamento de actina. Una TMod1 se une a ambas hebras de actina y a ambos dímeros de TM en el protofilamento de actina

Dematina: Dematina es una proteína de unión a actina con 2 sitios de unión a actina: uno en la cabeza y otro en la cola. La proteína recombinante es un monómero, pero la proteína nativa puede ser un trímero. Dematina se identificó por primera vez por su capacidad para agrupar filamentos de actina en cables, pero en los glóbulos rojos maduros, donde no existen esa disposición en cables, dematina tiene 2 funciones. Primero, la dematina no modificada se une a la espectrina y mejora la unión de la espectrina-actina, función que se pierde cuando la dematina es fosforilada por la proteína quinasa A. En segundo lugar, la dematina se une al transportador de glucosa y ayuda a unir la actina a la membrana.

Anquirina: La anquirina de eritrocitos une la espectrina a un complejo de la banda 3 y otras proteínas en la bicapa lipídica. La proteína tiene 3 dominios. El dominio de membrana está compuesto enteramente por repeticiones de anquirina. Es una estructura en espiral notablemente abierta, algo así como una hoz retorcida, que rodea y une a tetrámeros de banda 3. El sitio de unión de anquirina-espectrina está bien definido. El subdominio ZU5A de anquirina se une a un sitio especial creado por la unión de 14 o 15 repeticiones dentro de la espectrina β. Solo se une 1 anquirina por tetrámero, quizás por razones estéricas. La unión de anquirina promueve la formación de oligómeros y tetrámeros de espectrina en unas 10 veces, y viceversa. La unión de la anquirina a la banda 3 también refuerza la autoasociación de la espectrina. Presumiblemente, ambos mecanismos ayudan a regular la interacción de autoasociación relativamente tenue.

Tabla 5-1. Algunas proteínas de membrana de glóbulos rojos maduros.

Proteína	Peso Molecular kDa	Funciones en Membranas de Eritrocitos Maduros
Banda 3 (SLC4A1)	101,8	Canal de intercambio aniónico (especialmente HCO_3- y Cl-) con la ayuda de CAII y CAIV. Forma complejos de membrana con GPA, GPB, el complejo Rh, Glut1, estomatina y otras proteínas que se unen a la espectrina a través de la anquirina-1 y la proteína 4.2, y se unen al complejo de unión de actina a través de la proteína 4.1R, proteína 4.2, p55, aducina. y Glut1. Se une a la peroxiredoxina. Forma un metabolón glucolítico con G3PD, PFK, PGK, aldolasa, LDH y PK. Se une a la desoxihemoglobina. Transporta Ii y muchos otros antígenos de grupos sanguíneos.
p55 / Proteína 1 de membrana palmitoilada	52,3	Vincula el complejo de unión de actina a la membrana a través de interacciones con algunas moléculas de proteína 4.1R y GPC/D. Muy palmitoilado. Puede contribuir a la organización de balsas lipídicas.
α-aducina β-aducina	81,0 80,7	Limita el extremo de rápido crecimiento de la actina y recluta la espectrina en sitios cercanos con actina. Vincula la unión de actina a la banda 3, Glut1 y tal vez, a la estomatina. Une a coreína.
Actina	41,6	Forma filamentos de 37 nm de largo que sirven como unión molecular en el esqueleto de la membrana. Se une a la espectrina con la ayuda de la proteína 4.1R. Se une a la tropomiosina, la tropomodulina, la aducina, la dematina y la coreína.

Aldolasa A	39,4	Forma el complejo glucolítico en la banda 3 con PFK, enolasa, G3PD, PK y LDH.
Anquirina 1	206,0	Une β-espectrina y el esqueleto de la membrana a la banda 3 y la proteína 4.2 y RhAG en el complejo de la banda 3 unida a anquirina.
α-espectrina β-espectrina	280,0 246,4	Reticula los filamentos de actina en una red hexagonal en el extremo de la cola con la ayuda de la proteína 4.1R, aducina y dematina. Se une a la proteína 4.2 a través del dominio EF de α-espectrina. Se autoasocia en tetrámeros y oligómeros y se une a anquirina-1 y Lu / BCAM.
CAII CAIV	29,1 33,1	Se conecta a la superficie exterior (CAIV) e interior (CAII) de la banda 3, el canal HCO_3-. Cataliza la interconversión de CO_2 y HCO_3-, lo que ayuda en el transporte de HCO_3- y la eliminación de CO_2.
CD44	37,1	Se une a la proteína 4.1R y tal vez a la anquirina. Proteína multifuncional en células no eritroides. Se desconoce la función en el glóbulo rojo.
CD47	33,3	Se une a la proteína 4.2 y al complejo Rh (RhAG / RhD / RhCE) dentro del complejo de la banda 3 unida a anquirina. Inhibe la fagocitosis.
DARC/Duffy	35,6	Receptor de quimiocinas. Transporta el antígeno del grupo sanguíneo Duffy (Fy). Receptor de *Plasmodium vivax*. Se desconoce la función en los glóbulos rojos normales.
Dematina	43,1 / 45,5	Se une y agrupa los filamentos de actina. Facilita la unión de espectrina-actina. Ayuda a unir actina a la membrana a través de Glut1.
G3PD	35,9	Forma metabolón glucolítico en la banda 3 con aldolasa, PFK, enolasa, PK y LDH.
Glut1	54,1	Transporta glucosa. Transporta ácido L-deshidroascórbico cuando se une a la estomatina. Une la actina a la membrana a través de interacciones con dematina, aducina y banda 3.

GPA GPB	14,3 7,7	Se une a la banda 3 en el complejo de la banda 3 unida a anquirina, y tal vez a RhAG. Puede facilitar la transferencia de la banda 3 a la membrana. Transporta antígenos del grupo sanguíneo MNSsU y gran parte de la carga superficial negativa de los glóbulos rojos.
GPC GPD	13,8 11,5	Une el complejo de unión de actina a la membrana mediante interacciones con la proteína 4.1R, p55 y la banda 3. Transporta antígenos del grupo sanguíneo de Gerbich.
Kell Kx	82,8 50,9	El complejo Kx / Kell puede residir en el complejo de banda 3 unida a actina. Kell porta el antígeno del grupo sanguíneo Kell. Kx probablemente tiene una función de transporte no descubierta.
Lu/BCAM	64,3	Molécula de adhesión que transporta el antígeno del grupo sanguíneo Lu. Se une a la α-espectrina.
LW glycoprotein/ ICAM4	27,0	ICAM que porta el antígeno del grupo sanguíneo LW. Interactúa con RhAG / RhD / RhCE y probablemente reside en el complejo de banda 3 ligado a anquirina.
Peroxiredoxina 2	21,8	Proteína antioxidante abundante que está parcialmente ligada a la banda 3 de la membrana. También se une a la estomatina y activa el canal de iones de potasio dependiente de calcio (Gardos).
PFK (hígado) PFK (músculo)	85,0 85,2	Forma metabolón glucolítico en la banda 3 con aldolasa, G3PD, enolasa, PK y LDH.
Proteína 4.1R	66,4	Se une tanto a la β-espectrina como a la actina y refuerza en gran medida la interacción espectrina-actina. Une la actina a la membrana a través de interacciones con GPC/D, p55 y la banda 3. Compite con la anquirina por unirse a la banda 3.
Proteína 4.2	79,8 / 76,9	Se une a la banda 3, anquirina y CD47 en el complejo de la banda 3 unida a anquirina. También se une al dominio EF de α-espectrina.

RhAG RhCE RhD	44,2 45,4 45,1	El trímero RhAG / RhD / RhCE se une a CD47, LW, anquirina, CD47 y GPB en el complejo de banda 3 unido a anquirina. RhAG transporta NH_3 / NH_4^+ y quizás CO_2.
Estomatina	31,7	Se une a Glut1 y lo convierte en un transportador de ácido ascórbico. También se une a la banda 3, aducina y peroxiredoxina. Ubicado en balsas lipídicas.
Tropomodulina 1	40,6	Cubre el extremo de la actina de crecimiento lento. Une TM, lo que refuerza el cubrimiento.
Tropomiosina 1 (α-TM) Tropomiosina 3 (γ-TM)	32,9 32,9	Se une a los filamentos de actina y los estabiliza de forma dependiente de iones magnesio. Puede ayudar a especificar la longitud de los filamentos de actina en el glóbulo rojo.

HCO_3-: bicarbonato; Cl-: cloro; CAII: anhidrasa carbónica II; CAIV: anhidrasa carbónica IV; GPA: glicoforina A; GPB: glicoforina B; Glut1: transportador de glucosa 1; G3PD: gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa; PFK: fosfofructo quinasa; PGK: fosfoglicerato quinasa; LDH: lactato deshidrogenasa; PK: piruvato quinasa; GPC/D: glicoforina C y D; RhAG: Glicoproteína asociada a Rh; Lu: Lutheran; BCAM: molécula de adhesión de células basales; CO_2: dióxido de carbono; ICAM: molécula de adhesión intercelular; LW: Landsteiner-Wiener; NH_3 / NH_4^+: amoniaco / ion amonio; TM: tropomiosina.

4. ORGANIZACIÓN DE LA MEMBRANA ERITROCITARIA

La membrana de los glóbulos rojos es una bicapa lipídica compuesta por 50% de proteínas, 40% de lípidos y 10% de carbohidratos. Los carbohidratos en la superficie externa de la membrana son glicoproteínas y glicolípidos responsables de la identidad antigénica de las células y tienen un papel en la compatibilidad ABO. Por su parte, las proteínas integrales de la membrana están organizadas en complejos macromoleculares centrados en la banda 3, el canal de intercambio aniónico. La mayoría de las proteínas de la membrana periférica forman el esqueleto de la membrana, una red de proteínas de 40 a 90 nm de espesor que lamina la superficie de la membrana interna. El citoesqueleto está compuesto principalmente por espectrina, actina y sus proteínas asociadas (tropomiosina, tropomodulina, aducina y dematina), proteína 4.1R y anquirina.

4.1. Citoesqueleto de la Membrana Eritrocitaria

El citoesqueleto es una red organizada de proteínas que comprende componentes principales (por ejemplo, α y β-espectrina, actina, proteína 4.1, anquirina) y componentes secundarios (proteína 4.2, dematina (4.9), α y β-aducina, tropo-

miosina, tropomodulina, etc.), muchos de los cuales interactúan no solo entre sí, sino también con proteínas y lípidos de la membrana.

La red citoesquelética está regulada funcionalmente por el tipo y el alcance de las modificaciones postraduccionales (MPTS). Las MPTS citoesqueléticos conocidos incluyen fosforilación, metilación, miristilación, palmitilación o farnesilación. El Ca^{2+} y la calmodulina también participan en la regulación de las interacciones de las proteínas esqueléticas. Si bien todos los componentes principales y menores del citoesqueleto mencionados anteriormente se han encontrado en la proteómica de los glóbulos rojos, aún no se ha realizado y está justificado un estudio global detallado de las modificaciones postraduccionales, que podrían arrojar luz sobre la regulación de sus propiedades funcionales.

El reordenamiento de la red citoesquelética, que sigue a la deformación de la membrana, es posible gracias a la disposición estructural per se y los cambios dinámicos entre conformaciones extendidas y comprimidas. Los tetrámeros de espectrina ($\alpha 2\beta 2$) son los componentes clave de la red citoesquelética, que regulan la forma celular, la deformabilidad de la membrana, la estabilidad y la movilidad lateral de la banda 3. Las moléculas de espectrina están organizadas en un estado helicoidal altamente enrollado, lo que confiere una gran flexibilidad y en un estado similar a una varilla que les da propiedades de resorte y la capacidad de extenderse y contraerse (Figura 5-3).

Las micrografías electrónicas de tetrámeros de espectrina purificados o filamentos de espectrina en esqueletos completamente estirados muestran una molécula con estructura ondulada y con una longitud de extremo a extremo de hasta 200 nm, esta configuración es la forma en que se suele representar la espectrina en los modelos de membrana; Sin embargo, los filamentos de los esqueletos nativos sin estirar son mucho más compactos y cálculos simples muestran que la distancia promedio entre los filamentos de actina (es decir, la longitud de un tetrámero de espectrina) es solo de 60 a 70 nm *in vivo*. Esta longitud corresponde aproximadamente a la de los supuestos filamentos de espectrina en esqueletos nativos.

No se sabe cómo se pliega la espectrina en este estado de reposo, la mejor evidencia proviene de micrografías electrónicas visualmente mejoradas de espectrina en esqueletos parcialmente expandidos, que sugieren que las espectrinas α y β están enrolladas entre sí en una hélice de 2 inicios con 10 vueltas por tetrámero de espectrina. Algunas micrografías muestran filamentos de espectrina relativamente rectos; otros muestran algo de retorcimiento. Esta diferencia puede reflejar si los filamentos están bajo tensión. En este modelo, las moléculas de espectrina se extienden y contraen a lo largo del eje helicoidal al variar el paso y el diámetro de la doble hebra. Este comportamiento de resorte es presumiblemente crítico para el comportamiento elástico de la membrana.

Sin embargo, hay evidencia de otros modelos que proponen que las moléculas de espectrina adoptan una configuración aleatoria similar a un gusano, o que

los segmentos helicoidales de las repeticiones se funden y se extienden bajo tensión, o simplemente se despliegan cuando se someten a tensión. El hecho de que las cisteínas previamente ocluidas puedan marcarse cuando los glóbulos rojos se deforman por cizallamiento es una prueba de que algunas repeticiones se despliegan y que la espectrina puede incluso desprenderse de la anquirina o la actina cuando se estira. Debido a que la estructura de la espectrina afecta sus propiedades mecánicas, así como las relaciones espaciales de todas las demás proteínas que se unen a ella, definir su estructura *in vivo*, en reposo y cuando se deforma es una alta prioridad.

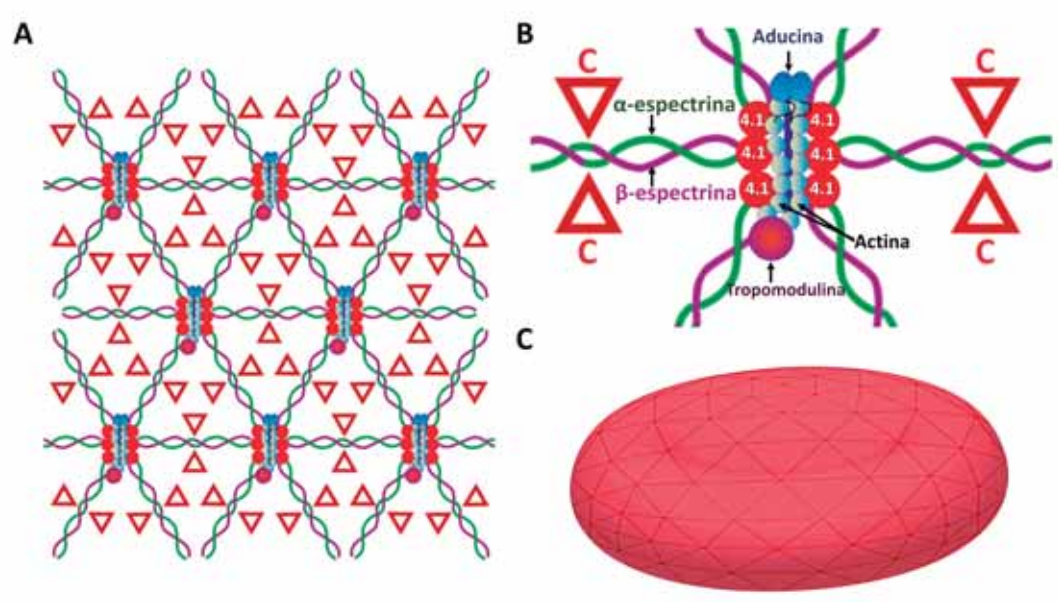


Figura 5-3. Citoesqueleto de membrana. A. Modelo del citoesqueleto de eritrocitos basado en espectrina-actina. **B.** Acercamiento de un borde de la red citoesquelética, los tetrámeros de espectrina en forma de varilla están conectados por complejos de unión que contienen filamentos cortos de actina, aducina, tropomodulina y proteína 4.1, formando así una red cuasi-triangular. Los extremos N-terminal de la β-espectrina se unen a la α-actina en las uniones, y los extremos C-terminal de la β-espectrina están en los centros de los bordes de la red (triángulos abiertos). **C.** Representación esquemática del citoesqueleto del glóbulo rojo.

4.2. Unión del Citoesqueleto a la Membrana Eritrocitaria

La unión de la red citoesquelética a la membrana está mediada por interacciones espectrina / anquirina / banda 3 y espectrina / banda 4.1 / glicoforina C. La interacción de la espectrina a través de la anquirina a la membrana está modulada por la proteína 4.1. La interacción de la proteína 4.1 con la glicoforina C, por otro lado, está regulada por p55 (un miembro de la familia MAGUK, guanilato quinasa asociada a la membrana). La participación de actina en el complejo de unión es importante, ya que la proporción de actina polimerizada a despolimerizada controla la flexibilidad de la membrana, que aumenta cuan-

do se inhibe la polimerización de actina (Figura 5-4). El control estricto de esta proporción lo ejercen cuatro proteínas menores: tropomodulina, tropomiosina, heterodímeros de αβ-aducina y dematina (proteína 4.9). Los complejos de tropomodulina-tropomiosina estabilizan los filamentos cortos de actina de los eritrocitos fortaleciendo las interacciones espectrina-actina, al tapar sus filamentos extremos puntiagudos o de crecimiento lento, mientras que la dematina (proteína 4.9) agrupa los filamentos de actina y las aducinas participan tanto en el taponamiento como en el agrupamiento de filamentos de actina. Las aducinas también desempeñan un papel en el ensamblaje temprano de los complejos espectrina-actina que forman un complejo ternario espectrina-actina-aducina.

La estequiometría del complejo de unión de actina es incierta. En promedio, 6 espectrinas y 6 proteínas 4.1R se unen por actina, y hay suficiente banda 3, glicoforina A, glicoforina C / D y probablemente suficiente transportador de glucosa 1 y estomatina para suministrar 6 complejos por filamento de actina; el complejo de unión de actina también contiene enzimas del metabolón glucolítico, así como las proteínas del grupo sanguíneo Kx / Kell y DARC / Duffy. Un hecho interesante y subestimado es que los complejos de unión de anquirina y actina están bastante cerca uno del otro *in situ* en la membrana y a menudo deben colisionar, especialmente durante la deformación de los glóbulos rojos, pero quizás incluso cuando la célula está en reposo. Este conocimiento plantea la interesante posibilidad de que proteínas como la banda 3, la proteína 4.1R, la proteína 4.2 y la aducina, que tienen compañeros de unión en ambos complejos, a veces puedan cambiar de un complejo a otro, pudiendo ser este un proceso regulador.

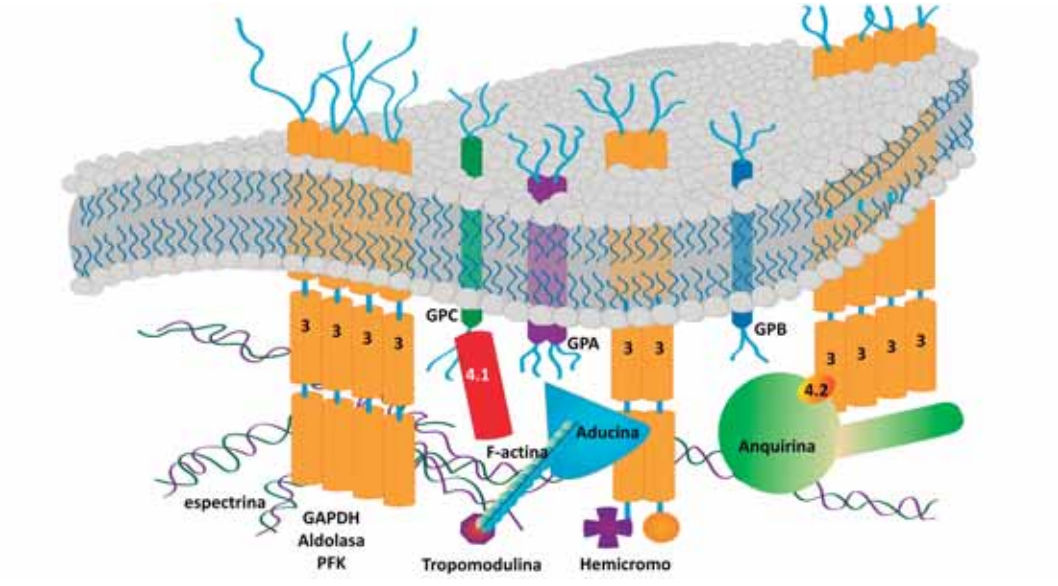


Figura 5-4. Modelo de membrana de los eritrocitos y el citoesqueleto subyacente. Representación esquemática simplificada de la interacción entre la membrana y el citoesqueleto subyacente, que no tiene como objetivo reproducir toda la topología exoplásmica / endoplásmica.

4.3. Transportadores de Membrana Eritrocitaria

El transportador de glóbulos rojos más importante es sin duda la banda 3, debido a que actúa como un intercambiador de aniones a través del cual los aniones bicarbonato y cloruro se intercambian rápidamente, mientras que los aniones más grandes (sulfato, fosfato, fosfoenol piruvato y superóxido) se transportan a velocidades mucho más lentas (Figura 5-5). El bicarbonato es producido por la anhidrasa carbónica eritrocitaria, mientras que su subproducto, el protón (H^+), se une a la hemoglobina y facilita la liberación de oxígeno a los tejidos.

El volumen de glóbulos rojos se regula a través de: (1) transporte de membrana activa, p. Ej. bombas, (2) transporte pasivo impulsado por gradientes y (3) varios canales. Si bien la membrana de los glóbulos rojos es permeable hasta cierto punto al agua y los aniones, es extremadamente impermeable a los cationes, lo que requiere sistemas de transporte específicos para ellos. Se han identificado transportadores de cationes usando proteómica, a saber, la isoforma de empalme 4 de la ATPasa 1 transportadora de cobre Q04656 y el transportador de zinc 1. Para mantener una concentración de cationes intracelulares opuesta a la del plasma (bajo en potasio, alto en sodio y calcio) los glóbulos rojos se basan en dos bombas de cationes dependientes de adenosina (ATPasa): la Na^+ -K^+ -ATPasa y la Ca^{2+}-ATPasa dependiente de Mg^{2+} activada por calmodulina, cuya existencia ha sido confirmada por proteómica.

Es interesante observar que mientras que la glucosa, la principal fuente de energía de los glóbulos rojos, ingresa a los eritrocitos a través de transportadores independientes de energía, la membrana de los glóbulos rojos es virtualmente impermeable para nucleótidos como ATP y GTP e intermediarios glucolíticos. La importancia del transporte de glucosa para los glóbulos rojos humanos se refleja en los proteomas, que identificaron tres transportadores de glucosa (GLUT1, GLUT3 y GLUT4), donde los dos últimos son característicos de los glóbulos rojos de mamíferos y están ausentes en las aves.

Varios transportadores pasivos dependen del gradiente creado por la Na^+–K^+ -ATPasa, a saber: 2 co-transportadores de cloruro (los co-transportadores de Na^+ –K^+ –Cl^- y los co-transportadores de K^+ –Cl^-) y un intercambiador de Na^+ – H^+. A su vez, se encuentran canales dependientes de voltaje y canales de Gardos (proteína 4 del canal de potasio activada por calcio de conductancia intermedia), que están regulados por calpromotina y AMPc, se activan por un aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular y responden expulsando iones de potasio. La proteómica también ha identificado un canal de potasio dependiente del pH, insensible al voltaje de baja abundancia, el miembro 5 de la subfamilia K del canal de potasio sensible a la quinina, que también puede estar involucrado en la expulsión de iones de potasio.

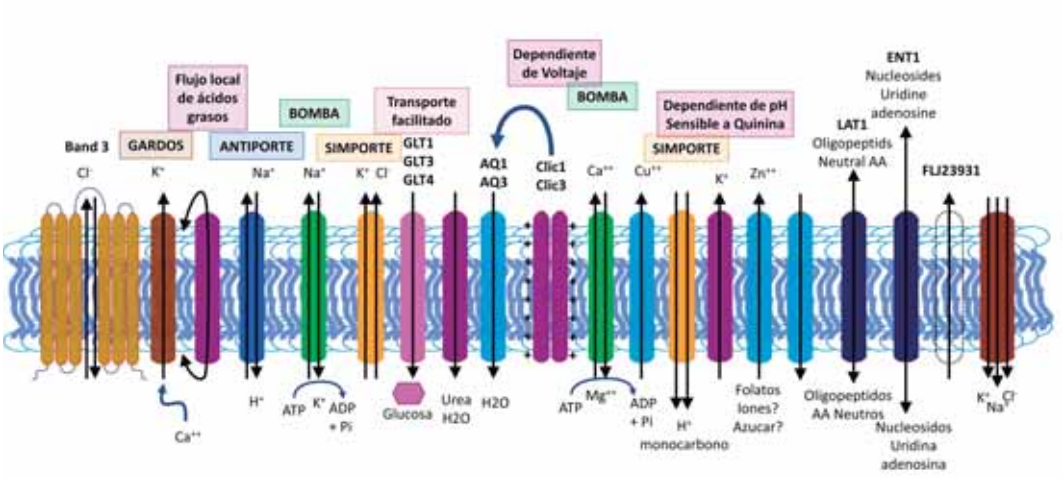


Figura 5-5. Resumen de los principales transportadores identificados por proteómica en la membrana de glóbulos rojos. Proteínas transmembrana (banda 3 se ha dibujado con más detalle, todas las demás están condensadas) implicadas en el transporte de nutrientes, iones y agua detectados por proteómica. En violeta, transportadores de baja expresión. Se cree que los canales dependientes del voltaje (Clic 1, Clic 3) regulan los canales de aquaporina. Los simportadores son en naranja, los antiportadores en azul, el transporte facilitado en rosa y las bombas en verde. El transporte bidireccional está en azul oscuro, los canales activados como consecuencia de un estímulo interno están en marrón; todos los demás están en azul pálido.

5. LECTURAS SUGERIDAS

Leiting Pan, Rui Yan, Wan Li and Ke Xu. 2018. Super-Resolution Microscopy Reveals the Native Ultrastructure of the Erythrocyte Cytoskeleton. Cell Reports 22, 1151–1158.

Samuel E. Lux IV. 2015. Anatomy of the red cell membrane skeleton: unanswered questions. Blood 127 (2), 187-199.

Erica M. Pasini, Hans U. Lutz, Matthias Mann, Alan W. Thomas. 2010. Red blood cell (RBC) membrane proteomics — Part I: Proteomics and RBC physiology. Journal of Proteomics 73, 403–420.

Natasha Yeow, Rico F. Tabor, Gil Garnier. 2017. Atomic force microscopy: From red blood cells to immunohaematology. Advances in Colloid and Interface Science 249, 149–162.

Elisabeth Karsten, Benjamin R. Herbert. 2020. The emerging role of red blood cells in cytokine signalling and modulating T immune cells. Blood Reviews 41, 100644.

Mithun N, Jijo Lukose, Ganesh Mohan, Shamee Shastry, Santhosh Chidangil. 2021. Single cell spectroscopy of red blood cells in intravenous crystalloid fluids. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 257, 119726.

Barbara J Bain. 2021. Structure and function of red and white blood cells and platelets. Medicine, 49(4), 183-188.

Amy Glenn and Catherine E Armstrong. 2019. Physiology of red and white blood cells. Anaesthesia & Intensive Care Medicine, 20(3), 170-174.

Joseph F. Hoffman. 2019. Reflections on the crooked timber of red blood cell physiology. Blood Cells, Molecules and Diseases, 79, 102354.

Capítulo

6

METABOLISMO

Simón Navarrete P., Iván Palomo G., Eduardo Fuentes Q.

Resumen

1. Introducción

2. Metabolismo de los eritrocitos
2.1. Glucólisis anaerobia
2.2. Metabolismo óxido-reductor (vía de las pentosas o hexosamonofosfato)
2.3. Metabolismo nucleotídico
2.4. Sistema de diaforasas

3. Lecturas sugeridas

RESUMEN

Los eritrocitos carecen de núcleo, mitocondria y otros organelos subcelulares, por lo tanto, su metabolismo es limitado. La principal función de los eritrocitos es el transporte de oxígeno, proceso que no requiere consumo de energía. Sin embargo, existe una variedad de procesos metabólicos que si dependen de energía y que son esenciales para la viabilidad de la célula. Las vías metabólicas del eritrocito permiten mantener el potasio intracelular alto, el sodio intracelular bajo y un calcio intracelular muy bajo, a través de bomba de cationes dependientes de energía; también permite mantener la hemoglobina en forma reducida, elevados niveles de glutatión reducido y ayudan a mantener la integridad y deformabilidad de la membrana. Las principales vías metabólicas del eritrocito son: Glucólisis anaerobia, Metabolismo óxido-reductor (vía de las pentosas o hexosamonofosfato), Metabolismo nucleotídico y Sistema de diaforasas. La glucosa es la principal fuente de energía del eritrocito y aproximadamente un 90% sigue la vía glicolítica hasta generar piruvato y 4 moléculas de ATP. A través de una reacción colateral (Shunt de Rapoport) se obtiene el mediador de la afinidad de la Hb por el O2, el 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG). Otro 10% es consumida en la vía de las pentosas y en este proceso es generado el glutatión reducido que es esencial para proteger a la célula de agentes oxidantes. Adicionalmente, las enzimas del metabolismo nucleotídico contribuyen al mantenimiento del ATP. Finalmente, el sistema de diaforasas contribuye a que el Fe hemínico de la hemoglobina se halle en estado reducido, lo que es esencial para cumplir su función de transporte de oxígeno y dióxido de carbono.

1. INTRODUCCIÓN

Los eritrocitos, glóbulos rojos o hematíes son células que carecen de núcleo, mitocondrias y otros organelos. Al carecer de mitocondrias no tienen un metabolismo oxidativo eficiente. Tampoco tienen ribosomas para la regeneración de proteínas dañadas o perdidas. No son capaces de sintetizar *de novo* lípidos y al carecer de núcleo no son capaces de dirigir procesos regenerativos, adaptarse al estrés circulatorio o dividirse para reemplazarse a sí mismos. Su función principal es el transporte y liberación de oxígeno y dióxido de carbono, proceso pasivo que no genera gasto de energía. Sin embargo, el eritrocito requiere energía para bombear iones contra gradientes electroquímicos, para mantener la forma, para mantener el hierro de hemoglobina en forma reducida y para mantener los grupos sulfhidrilo de enzimas y hemoglobina. La principal fuente de energía en el eritrocito proviene de la glucosa que en su mayoría es metabolizada en la vía glicolítica. Un menor porcentaje es metabolizada por la vía de las pentosas. Otras vías metabólicas contribuyen a mantener nucleótidos como el ATP y a mantener hierro reducido en la hemoglobina. En este capítulo se abordarán las principales vías metabólicas del eritrocito.

2. METABOLISMO DE LOS ERITROCITOS

Los eritrocitos no tienen núcleo, mitocondrias ni retículo endoplásmico; sin embargo, sí poseen enzimas citoplasmáticas que son capaces de metabolizar la glucosa y formar pequeñas cantidades de adenosín trifosfato (ATP) y la forma reducida de la nicotín-amida-dinucleótido fosfato, NADPH.

La glucosa es prácticamente el único combustible utilizado por los eritrocitos. La masa total de eritrocitos (para un adulto de 70 kg y 5 L de sangre) es de unos 2 kg y consumen unos 20 gramos de glucosa por día, lo que representa un 10% del metabolismo de la glucosa corporal (otro 70% lo consume el cerebro). El 90% de la glucosa penetra por difusión facilitada a través del transportador independiente de insulina GLUT-1. Una vez dentro del eritrocito, la glucosa pasa a convertirse en glucosa-6-fosfato (G_6P). Esta puede seguir dos vías.

El 80-90% se convierte en lactato mediante la vía glucolítica. A partir de una reacción colateral ("shunt" de Rapoport) se obtiene el mediador de la afinidad de la Hb por el O2, el 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG).

El restante 10% de la glucosa es sometida a oxidación por medio de la vía de las pentosas, también llamada *shunt* o desvío de la hexosa-monofosfato. Esta vía mantiene el glutatión en forma reducida para proteger a la Hb y la membrana del eritrocito de la oxidación por radicales libres (peróxidos y superóxidos) y por oxidantes exógenos (fármacos y toxinas).

El NADPH sirve a los eritrocitos de muchas e importantes formas:
- Mantiene la flexibilidad de la membrana celular.
- Mantiene el transporte de iones a través de la membrana. Permite regenerar el ATP que proporciona la energía necesaria para que la membrana del eritrocito mantenga útil la bomba de sodio-potasio, evitando así que el sodio y el agua penetren en su interior, lo que provocaría su destrucción. Es decir, contribuye a mantener la forma del eritrocito.
- Mantiene el hierro de la Hb en forma ferrosa (Fe^{+2}), en lugar de férrica (Fe^{+3}) que provoca la formación de metahemoglobina que no transporta oxígeno.
- Evita la oxidación de las proteínas de los eritrocitos.

La maduración eritroblástica conlleva la desaparición de prácticamente todas las vías presentes en cualquier otra célula. El eritrocito maduro es incapaz de sintetizar lípidos o proteínas y obtener energía a través del ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa. Su única fuente energética es la glucólisis anaerobia, cuyo rendimiento neto es de 2 ATP por cada molécula de glucosa oxidada. Esta fuente energética es suficiente para que desarrolle funciones que permiten su supervivencia en circulación. El eritrocito presenta 4 vías metabólicas: glucólisis anaerobia (vía de Embden-Meyerhof), metabolismo óxido-reductor (vía de pentosas fosfato y síntesis de glutatión), metabolismo nucleotídico, y sistema diaforásico (figura 6-1).

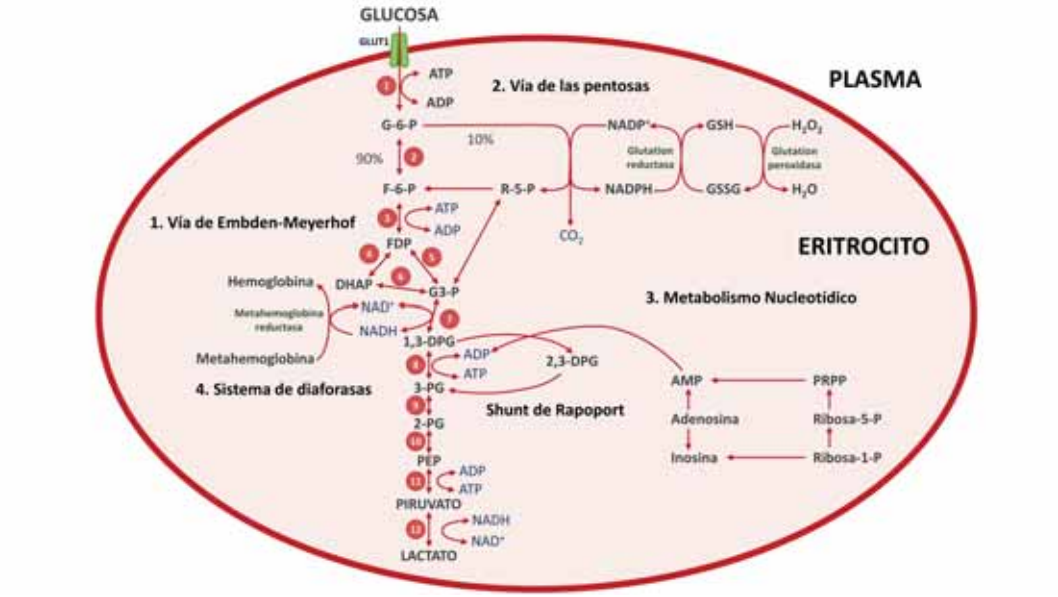


Figura 6-1. Metabolismo de los eritrocitos. Representación esquemática de las principales vías metabólicas del eritrocito: 1. Vía anaeróbica o de Embden-Meyerhof, 2. Vía aeróbica o vía de las pentosas ("shunt" o desvío de la hexosa monofosfato), 3. Metabolismo nucleotídico y 4. Sistema de diaforasas. Además, se observa el "shunt" o desvío de Rapoport, indispensable en la formación de 2,3-DPG.
1. Hexoquinasa, 2. Glucosafosfato isomerasa, 3. Fosfofructoquinasa, 4. Fructosadifosfato aldolasa, 5. Aldolasa, 6. Triosafosfato isomerasa, 7. Gliceraldehido 3-P deshidrogenasa, 8. Fosfoglicerato quinasa, 9. Fosfoglicerato mutasa, 10. Enolasa, 11. Piruvato quinasa, 12. Lactato deshidrogenasa

2.1. Glucólisis anaerobia

La glucosa que difunde hacia el interior de los eritrocitos es oxidada a piruvato mediante un proceso de glicólisis sin consumo de O_2 (anaerobio), en un proceso que consta de 2 etapas (figura 6-1): (a) Transformación de glucosa en Gliceraldehído-3-P (G3P) y Dihidroxiacetona-P (DHAP) con consumo de 2 ATP, y (b) Oxidación de ambos compuestos a piruvato y lactato con formación de 2 ATP por cada molécula de G3P (total 4 ATP/glucosa); el piruvato se transforma en lactato por la acción de la LDH (lactato deshidrogenasa) eritrocitaria.

La glucólisis anaerobia posee 3 enzimas que al catalizar reacciones irreversibles constituyen etapas limitantes: Hexoquinasa (HK) que transforma glucosa en Glucosa-6-P (G6P), fosfofructoquinasa (PFK) que transforma Fructosa-6-P (F6P) en Fructosa-1,6-diP (F1, 6DP), y piruvatoquinasa (PK) que transforma el Fosfoenolpiruvato (PEP) en piruvato.

Debido a que la vía de Embden-Meyerhof es la única fuente de energía del eritrocito, el déficit de una de estas enzimas es suficiente para bloquear su funcionamiento y ser causa de anemia hemolítica produciendo un aumento en los niveles de LDH plasmático.

Una derivación importante de la glucólisis anaerobia es el ciclo de Rapaport-Luebering (figura 6-2), que transforma 1,3 difosfoglicerato (1,3 DPG) en 2,3 DPG. El 2,3 DPG mediante fosforilación se transforma en 3-P glicerato y con ello cierra el ciclo. Ambas reacciones son catalizadas por una misma enzima, con doble función: mutasa y fosfatasa. Aunque la importancia de este ciclo deriva de la función reguladora del 2,3 DPG sobre la función hemoglobínica, es probable que este metabolito constituya un reservorio energético frente a situaciones, como una disminución de pH intraeritrocitario que disminuye la actividad glucolítica.

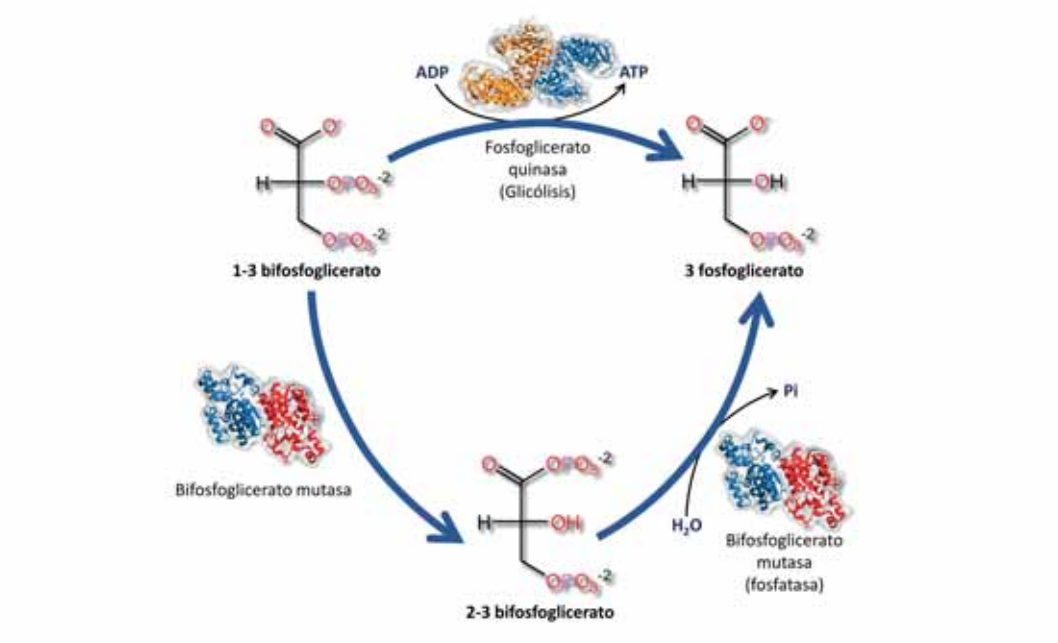


Figura 6-2. Shunt o Derivación de Rapoport-Luebering.

El 2,3 DPG es un anión altamente cargado que se une a las cadenas β de la Hb, favoreciendo la liberación del O2. El aumento de la concentración de 2,3 DPG en los glóbulos rojos, desplaza la curva de disociación de la oxihemoglobina hacia la derecha. Entre los factores que se sabe que elevan la concentración de 2,3 DPG en los eritrocitos humanos se cuentan la disminución del pH citosólico, las hormonas tiroideas, la hormona del crecimiento y los andrógenos.

Otra reacción importante de la glucólisis anaerobia es catalizada por la enzima gliceraldehído-3-P-DH, ya que mantiene el NADH en estado reducido, imprescindible para mantener al Fe de la Hb en estado reducido, a través de la reacción catalizada por NADH diaforasa o citocromo B5-reductasa.

2.2. Metabolismo óxido-reductor (vía de las pentosas o hexosamonofosfato)

Una vía alternativa a la glucólisis anaerobia es el ciclo de la hexosa monofosfato o vía de las pentosas (figura 6-3), que en condiciones normales deriva entre 5-10% del catabolismo de la glucosa. Esta vía funciona sin el consumo de oxí-

geno, de forma que su actividad puede aumentar 20-30 veces si se produce un brusco aumento de la oxidación intracelular.

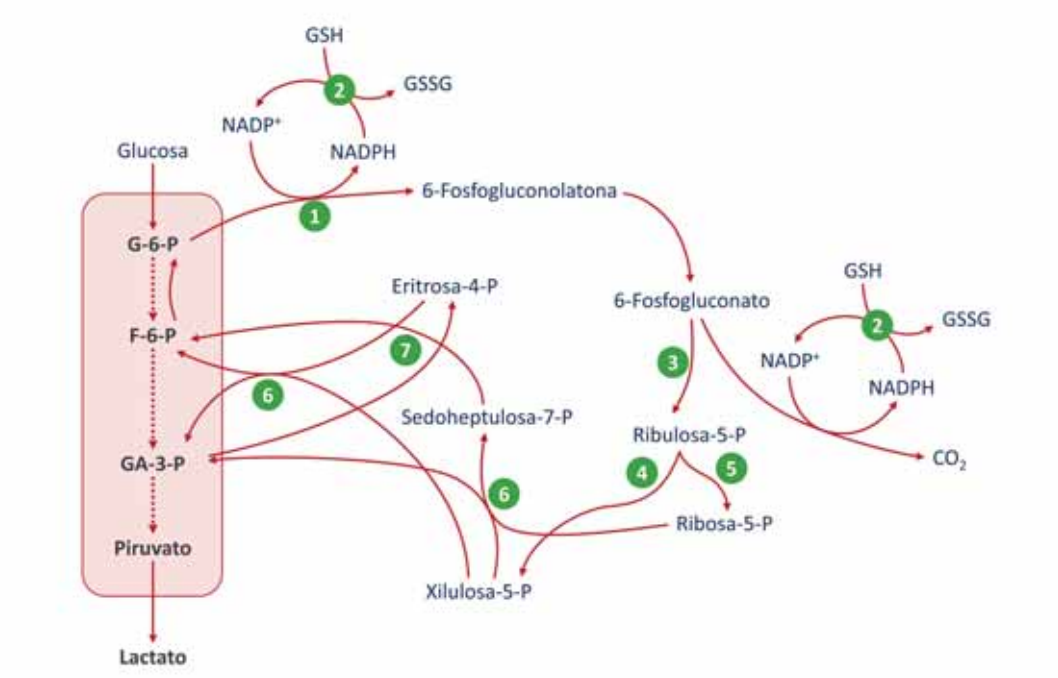


Figura 6-3. Vía de las pentosas.
1. Glucosa-6-P deshidrogenasa, 2. Glutatión reductasa, 3. Fosfogluconato deshidrogenasa, 4. Ribulosa-P epimerasa, 5. Ribosa-P isomerasa, 6. Transcetolasa, 7. Transaldolasa

El principal factor limitante es el cociente NADP+/NADPH y la enzima Glucosa-6P-DH, que precisa del cofactor NADP+, pero que a la vez es intensamente inhibida por NADPH (reducido).

En el desarrollo de su función, el eritrocito suele encontrarse sometido a agresiones oxidantes y el NADPH es por sí mismo insuficiente para amortiguarlas. La célula dispone de un compuesto, el Glutatión, que en estado reducido (GSH) realiza esta función. El glutatión es un tripéptido sintetizado por 2 enzimas que precisan consumo de ATP. Bajo forma reducida y mediante una reacción catalizada por la glutatión peroxidasa, elimina el exceso de peróxido. El nivel de GSH generalmente elevado, se mantiene gracias a NADPH (de la vía de las pentosas) y a la actividad de la glutatión reductasa. El poder reductor del eritrocito reside en su capacidad de regenerar NADPH, necesario a su vez, para mantener el nivel de GSH.

El déficit congénito de glucosa-6-P-DH implica una gran disminución del poder reductor eritrocitario.

Dado que el glutatión no difunde a través de membranas eritrocitarias, su concentración se mantiene gracias a un sistema en el que intervienen 2 enzimas: delta-glutamilcisteinasintetasa y glutatión sintetasa (figura 6-4).

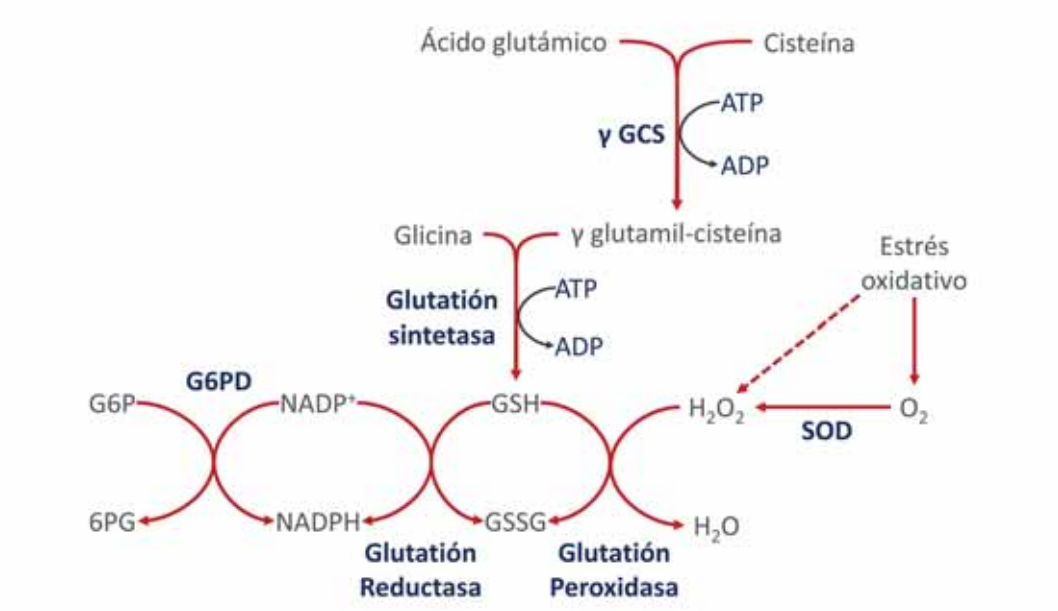


Figura 6-4. Síntesis y regeneración de glutatión.
GCL, Glutamato-cisteína ligasa
SOD, superóxido dismutasa

2.3. Metabolismo nucleotídico

Junto a las enzimas glucolíticas, el eritrocito dispone de otras enzimas que también contribuyen al mantenimiento del ATP (figura 6-5), y que actúan sobre la llamada mezcla de nucleótidos adenílicos (ATP y en mucho menor proporción ADP y AMP). Entre ellos se destacan la adenilatoquinasa (AK), la ATPasa, la adenosindeaminasa (ADA) y la pirimidina-5-nucleotidasa. AK y ATPasa contribuyen a reciclar el ADP a partir de ATP generado en la glucólisis. La ADA transforma adenosina en inosina y contribuye a su eliminación o reciclaje. AK y ADA utilizan el mismo sustrato (adenosina), lo que explica que tanto el déficit de AK como un exceso de ADA tengan una expresividad clínica similar, derivada del insuficiente reciclaje de AMP y la disminución de la concentración de ATP.

La pirimidina 5 nucleotidasa interviene en la degradación del RNA, y su déficit produce acumulación intraeritrocitaria de nucleótidos, que interfiere, tanto en la degradación normal del RNA como en la actividad de las enzimas clave de la glucólisis, disminuyendo la producción de ATP.

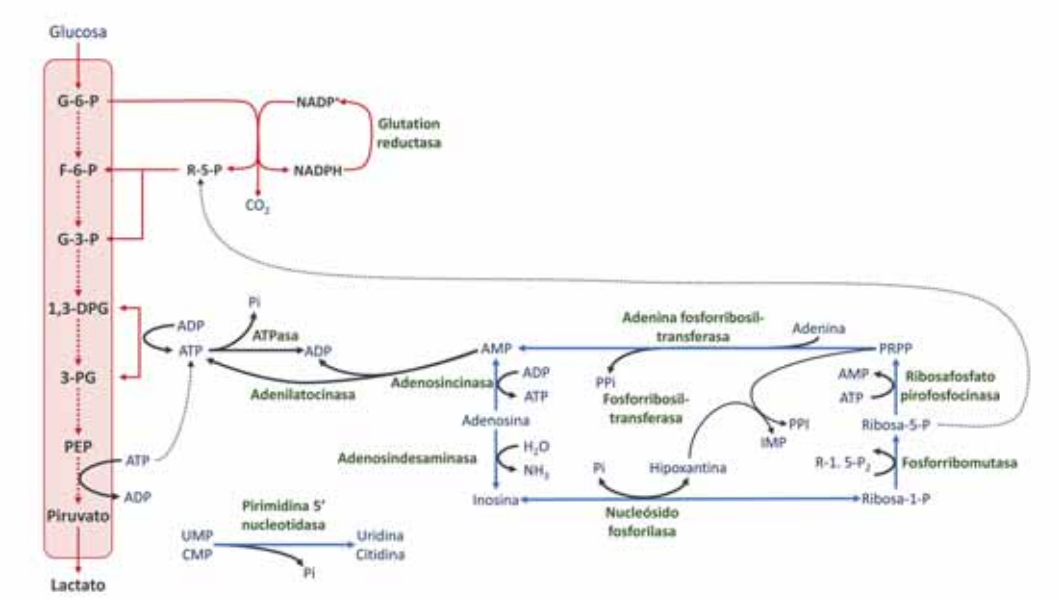


Figura 6-5. Metabolismo nucleotídico del eritrocito.

2.4. Sistema de diaforasas

El mantenimiento de la función respiratoria de la Hb, requiere que el Fe hemínico se halle en estado reducido. A ello contribuye la enzima diaforasa (figura 6-1) o metaHb reductasa (citocromo B5 reductasa). El GR normal posee 2 sistemas diaforásicos, el principal y el secundario. En el principal interviene la citocromo B5 reductasa, que utiliza el NADH y el secundario permanece inactivo.

La citocromo-B5-reductasa está presente en gran número de células del organismo y cataliza la transferencia de electrones desde el NADH al citocromo B5, que los cede directamente al Fe hemínico, manteniendo su estado reducido. La diaforasa que usa NADPH como sustrato, carece de aceptor fisiológico de electrones, por lo que permanece inactiva en condiciones normales. Ciertos colorantes como el azul de metileno son aceptores no fisiológicos de electrones, de tal forma que en caso de déficit del sistema diaforásico principal, pueden emplearse como tratamiento para disminuir el exceso de metaHb y eliminar la cianosis.

3. LECTURAS SUGERIDAS

Campanella ME, Chu H, Low PS. Assembly and regulation of a glycolytic enzyme complex on the human erythrocyte membrane. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005. 102(7):2402-7.

Messana I, Orlando M, Cassiano L, Pennacchietti L, Zuppi C, Castagnola M, Giardina B. Human erythrocyte metabolism is modulated by the O2-linked transition of hemoglobin. FEBS Lett. 1996. 390(1):25-8.

Climent F, Roset F, Repiso A, Pérez de la Ossa P. Red cell glycolytic enzyme disorders caused by mutations: an update. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets. 2009. 9(2):95-106.

Climent F, Roset F, Repiso A, Pérez de la Ossa P. Red cell glycolytic enzyme disorders caused by mutations: an update. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets. 2009. 9(2):95-106.

Lewis IA, Campanella ME, Markley JL, Low PS. Role of band 3 in regulating metabolic flux of red blood cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009. 106(44):18515-20.

Tavazzi D, Taher A, Cappellini MD. Red blood cell enzyme disorders: an overview. Pediatr Ann. 2008. 37(5):303-10.

Franco R, Navarro G, Martínez-Pinilla E. Antioxidant Defense Mechanisms in erythrocytes and in the Central Nervous System. Antioxidants (Basel). 2019. 8(2):46.

Srivastava SK, Beutler E. Glutathione metabolism of the erythrocyte. The enzymic cleavage of glutathione-haemoglobin preparations by glutathione reductase. Biochem J. 1970. 119(3):353-7.

Dudzinska W, Suska M, Lubkowska A, Jakubowska K, Olszewska M, Safranow K, Chlubek D. Comparison of human erythrocyte purine nucleotide metabolism and blood purine and pyrimidine degradation product concentrations before and after acute exercise in trained and sedentary subjects. J Physiol Sci. 2018. 68(3):293-305.

Percy MJ, Lappin TR. Recessive congenital methaemoglobinaemia: cytochrome b(5) reductase deficiency. Br J Haematol. 2008.141(3):298-308.

Capítulo

7

HEMOGLOBINA

Sergio Wehinger W., Iván Palomo G., Eduardo Fuentes Q.

Resumen
1. **Introducción**
2. **Hemoglobina**
   - 2.1. Estructura de la Hb
     - 2.1.1. Estructuras primaria a cuaternaria
     - 2.1.2. Hemo
     - 2.1.3. Tipos de hemoglobinas
     - 2.1.4. Ontogenia de la hemoglobina humana
   - 2.2 Función de la hemoglobina
     - 2.2.1. Transporte de oxígeno
     - 2.2.2. Descarga de oxígeno a los tejidos
     - 2.2.3. Mecanismo de carga de oxígeno
     - 2.2.4. Interacción hemo-hemo (cooperatividad)
     - 2.2.5. Sistema tampón de la Hb
     - 2.2.6. Transporte de CO2 por la Hb
     - 2.2.7. Interacción con aniones orgánicos
3. **Catabolismo de la Hb**
4. **Catabolismo del grupo hemo**
5. **Lecturas sugeridas**

RESUMEN

El característico color rojo de la sangre es debido al contenido de hemoglobina en los eritrocitos, la cual permite que estos realicen su principal función: el transporte de oxígeno, lo cual realizan durante aproximadamente 120 días, hasta que el sistema fagocítico mononuclear los retira de la circulación. Esta hemoglobina consta de una proteína tetramérica conjugada con grupos prostéticos hemo y una estructura cuaternaria compleja, en la que las interacciones entre sus subunidades -las cadenas globina- son cruciales para el transporte de oxígeno desde los pulmones al resto de los tejidos.

Existen varios tipos de hemoglobina, variando en la combinación y composición de sus cadenas globínicas, lo que da lugar a hemoglobinas con distinta afinidad al oxígeno, cuya expresión varía desde la gestación hacia el primer año de vida, predominando finalmente, la hemoglobina del adulto (Hb A_0). Las alteraciones en los niveles de los distintos tipos de hemoglobinas, son característicos de patologías genéticas como las talasemias. El estudio de los genes de las cadenas globinas, demuestra que todas provienen de un gen ancestral común a través de duplicaciones, translocaciones y diversas mutaciones cromosómicas.

Aparte de la función básica de transporte de oxígeno, la hemoglobina participa en otros procesos cruciales para la homeostasis como el transporte de CO_2 y mantenimiento del pH sanguíneo. Estas funciones están estrechamente ligadas a la estructura y composición de la hemoglobina, cuya estructura tetramérica desplazable le confiere un comportamiento de cooperatividad en la captación del oxígeno con su característica curva sigmoídea y efecto Bohr, así como su estrecha relación con la actividad glicolítica y cambios de pH celular.

Por otro lado, su catabolismo, genera importantes pigmentos en el organismo como la bilirrubina y los pigmentos biliares que confieren el color característico a las heces y la orina y cuyo estudio es de importancia en patologías hemolíticas y hepáticas.

En este capítulo se revisa la estructura y función de la hemoglobina, su síntesis y su catabolismo. Esto será la base bioquímica y molecular para, entre otros aspectos, entender las enfermedades asociadas a su carencia o a su síntesis anormal.

1. INTRODUCCIÓN

Los glóbulos rojos tienen como su función más importante el transporte de oxígeno desde los pulmones a los tejidos periféricos a este órgano. Para llevar a cabo esta función, los hematíes expresan una hemoproteína conocida como hemoglobina (Hb), la cual al trabajar con una molécula oxidante como el oxígeno (O_2), requiere ser mantenida y protegida. Para ello, tanto el núcleo como las estructuras citoplasmáticas del eritrocito, han sido reemplazadas por una solución concentrada de Hb, en la que también se encuentran enzimas antioxidantes y sustancias reductoras (NADPH + H^+, glutatión) encargadas de mantener un adecuado ambiente celular reductor.

La hemoglobina es una proteína conjugada con un grupo hemo, característica que es compartida por otras hemoproteínas con funciones biológicas asociadas a la captación de oxígeno, como la mioglobina, o a reacciones redox (citocromos, catalasas, etc.). Actualmente se piensa que el origen evolutivo de las hemoproteínas se encuentra en microorganismos que las utilizaban en la transferencia de electrones, para la obtención de energía, como en la fotosíntesis.

Sin embargo, la función más estudiada del grupo hemo es la captación y transporte de O_2 en los eritrocitos, función que, como en toda proteína, está íntimamente ligada a su estructura, la cual está basada en cuatro cadenas proteicas unidas por interacciones débiles y cada una de ellas está unidas fuertemente a un grupo hemo.

2. HEMOGLOBINA

2.1. Estructura de la Hb

La molécula de Hb es el resultado final de un largo proceso evolutivo que involucra la duplicación genética y sus posteriores mutaciones que dieron origen a las distintas cadenas globinas que configuran las diversas formas que conocemos hoy. Así, recientes investigaciones de las secuencias génicas de las cadenas sugieren que, por ejemplo, las cadenas alfa han evolucionado a partir de un gen ancestral común hace al menos unos 300 millones de años. Las cadenas beta, en cambio, han sufrido eventos de duplicaciones y delecciones, por lo que presenta una mayor diversidad y evolución independiente entre los distintos linajes de especies. De todas formas, tanto las cadenas alfa como la beta, surgieron desde un gen aún más ancestral, que fue también el origen de otras globinas emparentadas estructuralmente, como la neuroglobina, citoglobina y mioglobina (Figura 7-1).

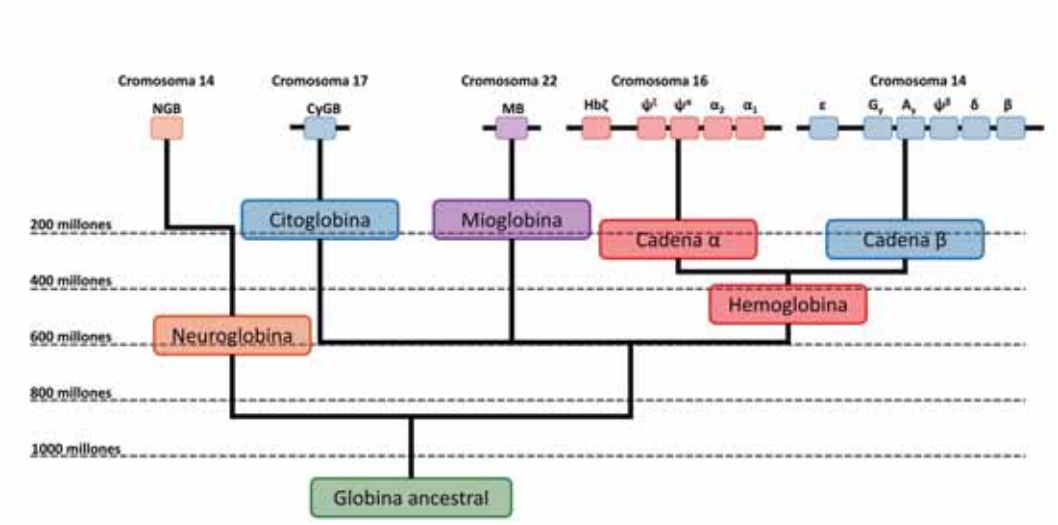


Figura 7-1: Evolución de las cadenas globinas (basado en Schechter, 2008).

La hemoglobina fue una de las primeras proteínas en ser estudiadas por cristalografía de rayos X, llevando al Premio Nobel de Química a Max Perutz en el año 1962. Su principal característica es tener como grupo prostético (estructura no proteica covalentemente unida a las cadenas aminoacídicas) al grupo hemo. Si bien no es la única proteína conocida por poseer el grupo hemo (mioglobina, citocromos, catalasa, etc.), es la más estudiada y conocida. Las características funcionales de la Hb como un transportador de gases fueron determinadas más de medio siglo antes de que se formulara su estructura proteica. El conocimiento de su estructura y función es fundamental para entender y comprender el comportamiento de las hemoglobinas anormales y valorar la importancia que su déficit o ausencia origina.

La Hb cumple varias funciones conocidas, como la catalítica (con actividad nitrito reductasa, NO dioxigenasa, monooxigenasa, alcalilhidroxiperoxidasa, esterasa, catalasa y lipooxigenasa, a pesar de no ser una enzima propiamente tal), en el metabolismo del NO, regulación metabólica celular, regulación del pH (transporta H^+ y CO_2) y participación en el metabolismo redox. Sin embargo, es por el transporte de oxígeno en la sangre, que es ampliamente estudiada y conocida. En la mayor parte de los invertebrados, el pigmento que transporta O_2, la hemocianina, circula libremente en el plasma más que dentro de células, lo cual es bastante ineficiente. La Hb al estar libre en el plasma, ejerce una presión osmótica de alrededor de cinco veces más que la producida por las proteínas plasmáticas por sí solas. Al estar dentro de los eritrocitos, la viscosidad de la sangre puede ser mantenida a un bajo nivel, no provocando deshidratación de los tejidos. En los seres humanos, en cada hematíe hay alrededor de 280 millones de moléculas de Hb, cada una con un peso molecular de 64.458 daltons, con una forma elipsoide y unas dimensiones de 64 x 55 x 60 Å, (2 subunidades alfa de 15.750 daltons y 2 subunidades beta de 16.500 daltons).

En la mayoría de los vertebrados, la Hb forma un tetrámero con dos subunidades, siendo mayoritariamente en etapa adulta, con dos cadenas alfa (α_1 y α_2) y dos beta ($ß_1$ y $ß_2$), estructuralmente similares, ya que tiene un origen genético ancestral común (Figura 7-1).

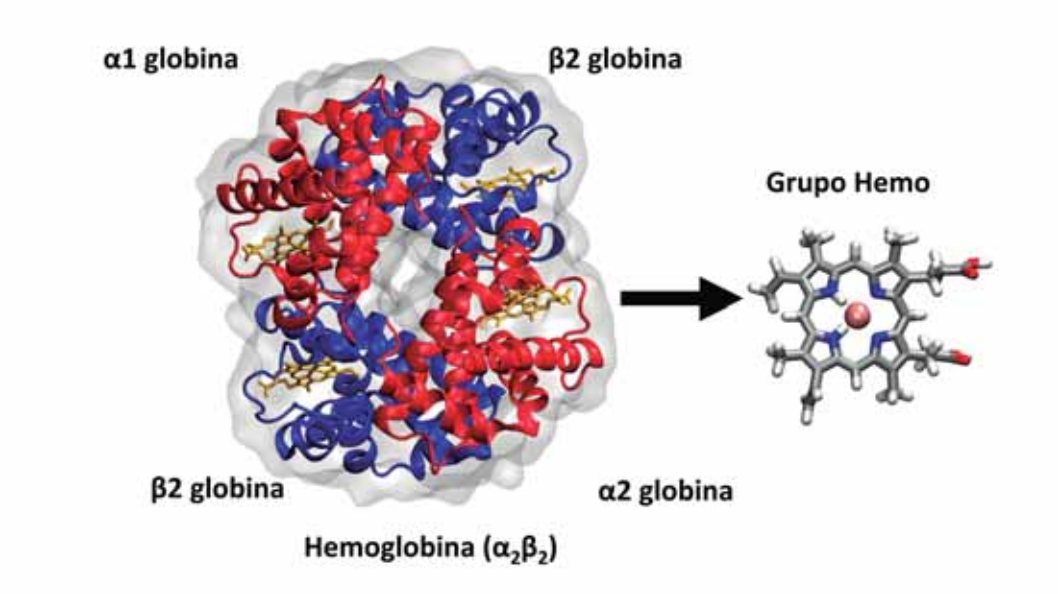


Figura 7-2. Esquema de la estructura general de las cadenas globinas de la hemoglobina A_0 α2ß2, mostrando la ubicación del grupo hemo en amarillo.

Como proteína conjugada o heteroproteína, la Hb posee una parte no aminoacídica correspondiente al **grupo prostético**, que se conoce con el nombre de **hemo**, el cual está formado por la unión de una protoporfirina IX y un átomo de hierro en estado ferroso (Fe^{+2}). La porción proteica corresponde a las cadenas globina, siendo cada una de ellas una cadena proteica individual globular, que se unen en un tetrámero integrado por cuatro subunidades iguales 2:2. Según los estudios, originalmente esta proteína constaba de una sola cadena monomérica, similar a como es hoy la mioglobina.

Las cadenas globinas de Hb humana se denominan en base a las letras del alfabeto griego: alfa (α), beta (ß), gamma (γ), delta (δ), épsilon (ε) y zeta (ς). De sus combinaciones, siempre de 2:2, se van a estructurar las diferentes formas de hemoglobinas que se expresan diferencialmente en los períodos embrionario, fetal, neonatal y adulto. En condiciones normales se forman seis variantes de Hb: tres de ellas son hemoglobinas embrionarias transitorias, con gran afinidad por el O_2: Gower 1 ($\varsigma_2\ \varepsilon_2$), Gower 2 ($\alpha_2\ \varepsilon_2$) y Portland I ($\varsigma_2\ \varepsilon_2$). Las Hb fetales ($F_0$: $\alpha_2\ G\gamma_2$) y (F_1: $\alpha_2\ A\gamma^{I}_2$) presentes al nacimiento en una proporción de 7:1 respectivamente, son las Hb más importantes del feto y el neonato (65%-95% del total), produciéndose solamente como trazas en la vida adulta en condiciones normales (<1%). En ciertas situaciones donde la expresión o función de la hemoglobina adulta normal falla, que pueden ser condiciones adquiridas o hereditarias, se

observa un aumento de la Hb fetal y fundamentalmente en base a F_1 (α_2 $A\gamma^I{}_2$). Las hemoglobinas encontradas después del nacimiento son: A_0 (α_2 $ß_2$) y A_2 (α_2 δ_2). La Hb A_0 representa aproximadamente el 97% de la Hb del adulto. La Hb A_2 es una pequeña fracción que existe en los individuos normales, en una cantidad de aproximadamente 2,5% (ver tabla 7-1). Los distintos tipos de Hb fetales se revisarán más adelante en este capítulo.

Tabla 7-1: Hemoglobinas Humanas

Tipo	Símbolo	Nombre/Cadenas Globina
Hemoglobinas Embrionarias	HbE_1	Gower 2/α_2 ε_2
	HbE_2	Gower1/ς_2 ε_2
	HbE_3	Portland I/ς_2 γ_2
Hemoglobinas Fetales	HbF_0	α_2 $G\gamma_2$
	HbF_1	α_2 $A\gamma^I{}_2$
Hemoglobinas del Adulto	HbA_0	α_2 $ß_2$
	HbA_2	α_2 δ_2

Existen tres condiciones imprescindibles que deben ser satisfechas para que la globina funcione en forma adecuada:

- Libre acceso a las capas de solvatación del agua en la superficie de la globina para mantenerla en solución, para ello el exterior molecular debe ser rico en cadenas laterales hidrofílicas polares.
- El interior de la molécula debe seguir siendo predominantemente hidrofóbico, resultado de su alto contenido en aminoácidos apolares.
- La molécula de globina debe mantenerse lo suficientemente rígida, lo que se logra con una proporción extraordinariamente alta de aminoácidos que forma una estructura secundaria de tipo cadenas alfa-hélice.

2.1.1. Estructuras primaria a cuaternaria

a) Estructura primaria

De los 20 aminoácidos proteicos codificados en el genoma, la Hb incorpora en su estructura a 17 de ellos. Como se mencionó, hacia el exterior se agrupan los residuos aminoacídicos de carácter más polar, mientras que hacia el interior y rodeando al grupo hemo, los residuos aminoacídicos más numerosos son los hidrófobos (alanina, valina, leucina), siendo una excepción destacable, el aminoácido básico histidina, cuyo grupo imidazol es responsable en forma importante de las propiedades funcionales de la molécula, como el poder tampón: la histidina tiene un pK3 de su radical de 6,0; lo que le confiere alta capacidad tamponante a pH fisiológico (pH 7,4); y por otro lado, el efecto Bohr, donde la afinidad del grupo hemo por el CO_2 se ve disminuida por la unión de protones hidrógeno a la cadena globina, facilitando la entrega de aquel desde la Hb en los vasos

capilares. Muchas posiciones en las diferentes cadenas de globina están ocupadas por el mismo aminoácido, este fenómeno se conoce como "homología de secuencia", dado su origen ancestral genético común, siendo muy importante para el funcionamiento de la molécula, ya que las secuencias altamente conservadas, suelen ser funcionalmente claves. La secuencia aminoacídica de las cadenas globínicas, se conocen en muchas especies. Existen nueve posiciones en la secuencia que contienen el mismo aminoácido, en prácticamente todas las especies estudiadas hasta ahora (tabla 7-2).

Tabla 7-2. Residuos aminoacídicos permanentes en la Hb

Posición*	Aminoácido	Función
F8	Histidina	Histidina proximal ligada al hemo
E7	Histidina	Histidina distal próxima al hemo
CD1	Fenilalanina	Contacto con el hemo
F4	Leucina	Contacto con el hemo
B6	Glicina	Permite máxima aproximación de hélices B y E
C2	Prolina	Término de la hélice
HC2	Tirosina	Enlaces cruzados de las hélices H y F
C4	Treonina	Desconocida
H10	Lisina	Desconocida

*Las cadenas alfa-hélice de las globinas se designan con letras A-H, desde el extremo ámino-terminal. F8 significa: el octavo residuo de la cadena F. Los residuos de los segmentos no helicoidales se designan con las letras de la cadena que la precede y la que le sigue. CD1 significa: el primer residuo del segmento no helicoidal entre las cadenas C y D. Los situados al inicio de las cadenas se designan NA (N-terminal) y los del final, HC (C-terminal).

Las cadenas (o subunidades) α y ß se componen de 7 y 8 alfa-hélices, respectivamente, que se designan con las letras A, B, C, D, E, F, G y H. Estas hélices están conectadas por segmentos no helicoidales (las "esquinas"). Cada una de estas subunidades globínicas contiene un bolsillo de unión al grupo hemo formado principalmente por las hélices E y F. A continuación, se describen las distintas subunidades.

Cadena α

La cadena de α-globina humana consiste en 141 residuos de aminoácidos en secuencia lineal. El grupo hemo está unido covalentemente por un enlace entre el hierro del hemo y el grupo imidazol de un residuo de histidina en la posición 87. Esta es la denominada histidina proximal (F8) para esta cadena y constituye una de las 8 uniones de enlaces covalentes de coordinación del átomo de hierro. La histidina distal en esta subunidad corresponde a la His 58 (E7). Esta configuración permite que el hierro se una al O_2 o a otros gases en el bolsillo

distal del hemo a través de una unión covalente, formando una coordinación octaédrica. La producción de α-globina depende de dos genes ubicados en el cromosoma 16: *HBA1 y HBA2*, siendo normalmente mayoritaria la expresión de HBA2 (60%).

Cadena ß

La cadena ß es ligeramente más larga que la cadena α (146 residuos) con una hélice más (la H). El hemo se une a la histidina 92 de la cadena ß globina, constituyendo la histidina proximal (F8) que se une al hierro hem en esta cadena. La histidina 63 corresponde a la distal (E7) para esta cadena. A diferencia de muchas otras proteínas, no hay puentes disulfuro ya sea dentro o entre las subunidades de Hb, aunque sí hay cisteínas. El residuo de cisteína en posición 93 de la cadena ß es altamente reactivo y fácilmente se oxida para formar disulfuros mixtos y otros tioésteres. Este fenómeno puede estar involucrado en el catabolismo de la Hb. La cadena está codificada por el gen *HBB* en el cromosoma 11.

Cadenas δ, γ, Ɛ y ς

Existe una considerable homología estructural entre las cadenas δ, γ, Ɛ y las cadenas ß. En realidad, estas cadenas son sintetizadas a partir de un grupo de genes localizados en el cromosoma 11. De igual manera, la cadena ς es homóloga con la cadena α, siendo ambas producto de un grupo de genes localizados en el cromosoma 16 (figura 7-3). Todos estos genes surgieron por duplicación de un gen anterior en común en los cromosomas, cuyas mutaciones posteriores dieron origen a las distintas cadenas.

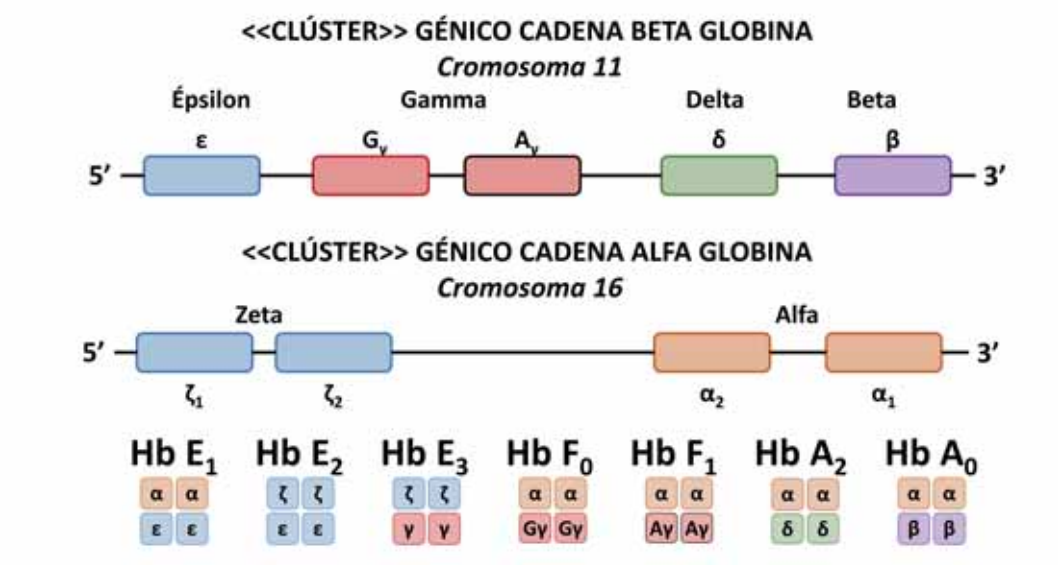


Figura 7-3. "Clústeres" de los genes para las cadenas α y ß globinas y sus combinaciones para formar las distintas hemoglobinas.

b) Estructura secundaria

La estructura secundaria está determinada por la relación espacial entre los residuos que están cercanos unos de otros en la secuencia lineal. Esta estructura se estabiliza principalmente por enlaces tipo puentes de hidrógeno entre los grupos amino y los carbonilos de los enlaces peptídicos intracatenarios. En el caso de las cadenas globinas, la estructura predominante es la hélice α. Las subunidades de Hb son muy buenos ejemplos de un patrón clásico de hélice α dextrógira, consistiendo de 3,6 aminoácidos por vuelta (modelo Pauling-Corey-Branson). Los puentes de hidrógeno se forman entre el hidrógeno del grupo amino el enlace peptídico con el oxígeno del grupo carbonilo de un enlace 4 residuos atrás.

En su estado nativo, aproximadamente el 75% de la molécula de Hb es una hélice α. Este relativamente alto contenido helicoidal, en comparación con otras proteínas globulares, simplifica la solución de su estructura tridimensional. En ciertas localizaciones específicas de las subunidades de Hb, la α hélice es interrumpida por segmentos que pierden la configuración helicoidal, adoptando así una disposición lineal por donde la cadena suele "angularse" (esquinas). Como se mencionó, las cadenas helicoidales se denominan en letras. Así, la subunidad ß cuenta con sus 8 segmentos helicoidales, desde la A hasta la H. Los segmentos helicoidales de la cadena α son comparables a los de la cadena ß, con excepción de los residuos que constituyen la hélice D de la cadena ß, que están ausentes en la cadena α. La homología entre subunidades de Hb de diferentes especies se mantiene, de tal forma que residuos que son importantes para la función de la molécula se conservan a través de la evolución de las especies. Así por ejemplo todas las hemoglobinas cuya estructura es conocida, tienen un residuo de histidina en la posición F8, excepto dos metahemoglobinas: la M-Iwate y la M-Hyde Park.

c) Estructura terciaria

La estructura terciaria se refiere a cómo está plegada tridimensionalmente cada cadena polipeptídica, lo que está determinado por la situación en el espacio de los residuos aminoacídicos que forman parte de la estructura lineal, lo que facilita la comprensión de las propiedades funcionales de la proteína. Hoy en día, existen evidencias claras de que la secuencia primaria de los aminoácidos es la que determina fundamentalmente los plegamientos de la proteína en el espacio tridimensional, y que solamente esta secuencia primaria, que está determinada genéticamente, define posteriormente las estructuras secundaria y terciaria por uniones entre los grupos químicos y radicales de los aminoácidos que forman la misma (figura 7-4).

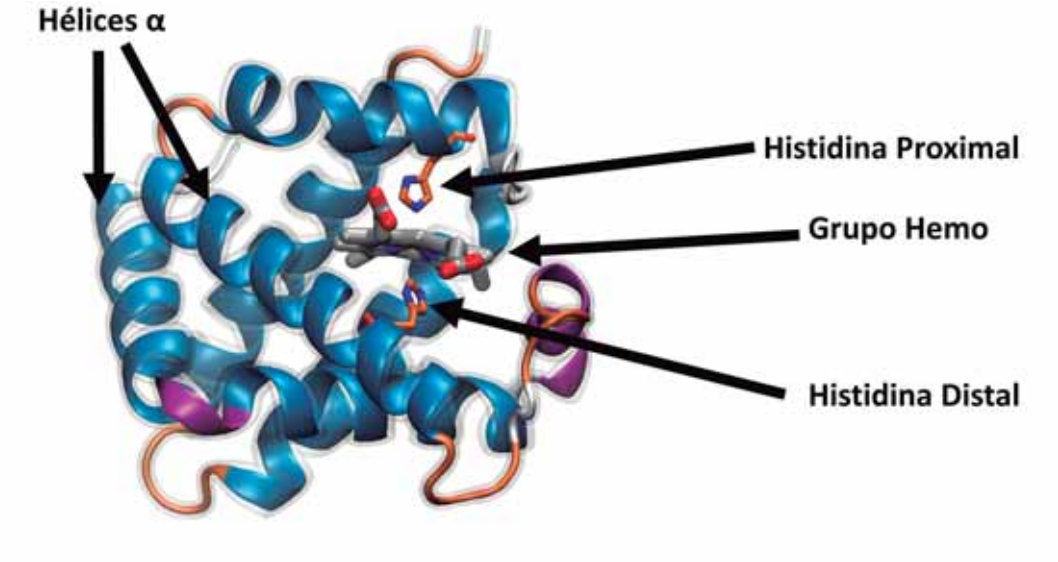


Figura 7-4. Estructura terciaria de la una cadena globina.
La figura muestra una cadena de globina con su respectivo grupo hemo, y las histidinas distal y proximal.

Los plegamientos hacen que dentro de la forma esferoide que adopta la molécula, se cree una cavidad donde se alojará el hemo, denominada "bolsillo", limitada por las hélices B, G, H en el fondo, por la E y F en sus paredes y con una apertura próxima a la superficie tapada en parte por las hélices C y D. Esta cavidad está esencialmente tapizada por residuos cuyas cadenas laterales, de tipo hidrófobas, evitan la presencia de agua y por tanto la oxidación del átomo de hierro, permitiendo el transporte reversible del O_2. Existen además numerosos puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals que mantienen la cohesión externa de la estructura terciaria.

d) Estructura cuaternaria

La estructura cuaternaria está referida a la forma en cómo se articulan las cuatro cadenas globinas, lo cual se realiza por uniones débiles de tipo enlaces iónicos, interacciones hidrofóbicas y fuerzas no covalentes tipo Van der Waals. El hecho de que estas interacciones sean débiles, parece ser importante, ya que permite a las subunidades de Hb disponerse en dos dímeros que pueden desplazarse levemente uno respecto al otro en presencia de O_2. Estos cambios conformacionales influyen en la afinidad de la Hb por el O_2. Lo anterior implica que la combinación e interacción de las cadenas α-ß o α-γ para formar los tetrámeros $\alpha_2ß_2$ o $\alpha_2\gamma_2$ es esencial para las características funcionales de la hemoglobina como la curva de disociación de tipo sigmoidea de unión y disociación del O_2 y efecto Bohr.

De esta manera, cada cadena α contacta con las dos cadenas ß a lo largo de dos diferentes superficies: de aquí que si las subunidades son designadas α_1, α_2, $ß_1$ y $ß_2$, pueden definirse dos interfases entre distintos dímeros de subunidades: $\alpha_1ß_1$

y $\alpha_1ß_2$ que son estructuralmente idénticas a las de $\alpha_2ß_2$ y $\alpha_2ß_1$, respectivamente. La interfase entre $\alpha_1ß_2$ y $\alpha_2ß_1$ permanece relativamente fija durante la oxigenación. La unión entre las cadenas α_1 y $ß_1$ así como α_2 y $ß_2$ es muy estrecha, debido a los 40 contactos entre residuos que se producen en esta interfase, incluyendo 9 puentes de hidrógeno, por lo que no hay diferencias entre la forma oxi y desoxihemoglobina, permitiéndose movimientos de tan solo 1 Å. El contacto en la interfase entre $\alpha_1ß_1$ y $\alpha_2ß_2$, al contrario del previamente señalado, permite un desplazamiento y rotación considerables durante la oxigenación y desoxigenación del tetrámero de hasta 7 Å. Esto a su vez, permite un giro de 15° del dímero $\alpha_1ß_1$ respecto al $\alpha_2ß_2$ y disminuye la cavidad entre $ß_1$ y $ß_2$ (Figura 7-5).

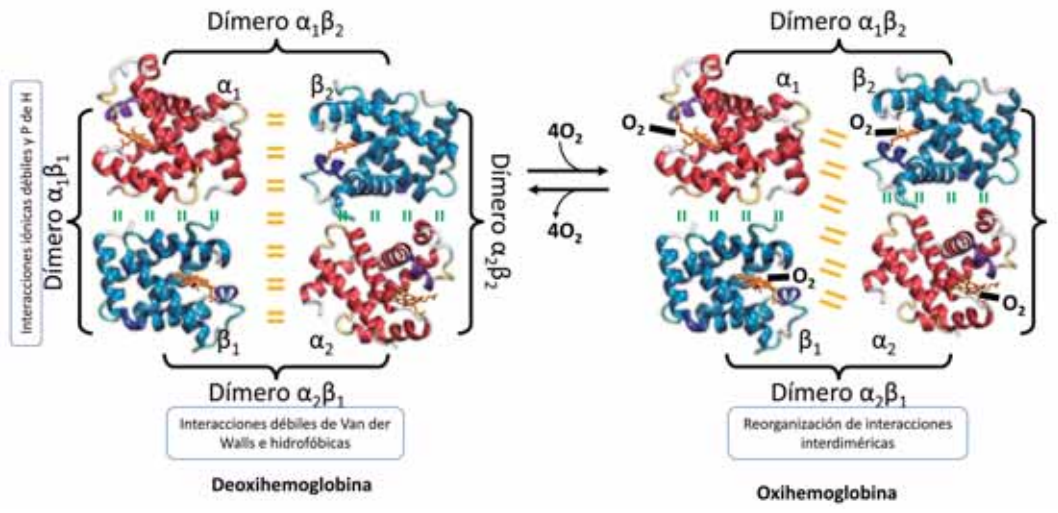


Figura 7-5. Esquema de la estructura cuaternaria de HbA_0 y movimientos entre las cadenas globinas. Se ilustran las diferentes cadenas α y ß, formando dos combinaciones de dímeros: $\alpha_1ß_1/\alpha_2ß_2$ y $\alpha_1ß_2/\alpha_2ß_1$, cuyas interacciones débiles mantienen la estructura, pero permiten cierta movilidad entre los dímeros $\alpha_1ß_1$ respecto a $\alpha_2ß_2$, importante en los cambios conformacionales que regulan la afinidad de la Hb por el O_2. (P de H: puentes de hidrógeno).

Debido a que el contacto $\alpha_1ß_1$-$\alpha_2ß_2$ está cerca del hemo, cualquier movimiento de la histidina proximal en la oxigenación y desoxigenación podría esperarse que tenga un efecto en esta interfase y viceversa. En realidad, la disposición de los dos dímeros a lo largo del contacto α_1-$ß_2$ y α_2-$ß_1$ es una característica fundamental de la interacción hemo-hemo. Solamente 19 residuos están comprometidos en el contacto α_1-$ß_2$ y α_2-$ß_1$, 10 en la cadena α y 9 en la cadena ß. Las fuerzas involucradas son principalmente no polares del tipo Van der Waals.

Estos movimientos dan lugar al cambio en el estado "tenso" (T) al estado "relajado" (R) de las cadenas globinas, de manera que se presenta el fenómeno de cooperatividad, en la que el ingreso de la primera molécula de O_2 facilita la unión con las siguientes, dando lugar a la curva sigmoídea de la cinética de saturación (Figura 7-6).

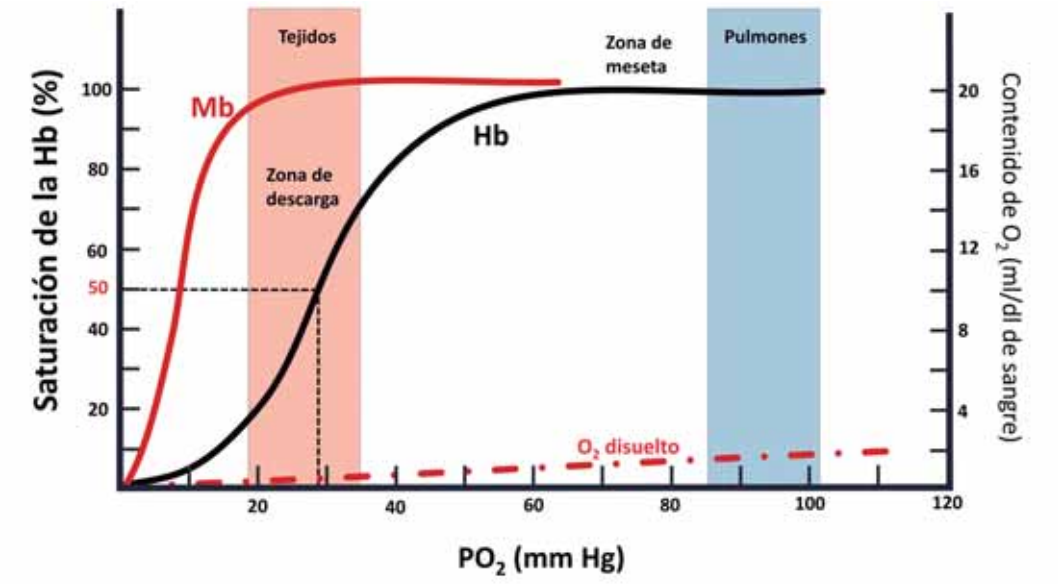


Figura 7-6. Gráfica de la saturación de O_2 en la hemoglobina y mioglobina. Se aprecia el efecto de cooperatividad en la curva sigmoídea de la hemoglobina (Hb), debido a que los cambios conformacionales inducidos por la llegada del primer O_2 a las cadenas globínicas, favorece la llegada de los siguientes a las restantes cadenas. No ocurre lo mismo con la mioglobina (Mb) que consta de solo una unidad, ya que su función es de reserva de O_2.

Debido a la importancia del movimiento a través de este contacto, muchos de los aminoácidos comprometidos se mantendrán altamente conservados en la evolución, evidente al comparar las secuencias de las cadenas globinas de las hemoglobinas de las distintas especies de vertebrados.

El contacto entre cadenas similares (α_1-α_2 y $ß_1$-$ß_2$) son mínimos. Una cavidad interna tapizada por aminoácidos polares y llena con agua, separa en forma parcial las cadenas similares una de otra. La unión entre las dos cadenas α, aunque escasa, es de importancia fisiológica. Ocurre solo en la molécula de desoxihemoglobina y juega un importante papel en la interacción hemo-hemo, efecto Bohr y transporte de CO_2. Por su parte, las cadenas ß están más ampliamente separadas que las cadenas α. El hueco dejado en la conformación desoxigenada es capaz de acomodar una molécula de 2-3 difosfoglicerato (2-3 DPG) en la conformación oxigenada, de manera que cuando las cadenas ß se mueven en conjunto, este hueco se hace más estrecho, expulsando a la molécula de 2-3 DPG.

2.1.2. Hemo

a) Estructura del grupo Hemo

El hemo es el grupo prostético de la Hb, constituido por una ferroprotoporfirina IX, esto es un esqueleto formado por cuatro anillos pirrólicos unidos covalentemente en una estructura circular heterocíclica, denominada protoporfirina IX,

rodeando a un átomo central de hierro ferroso (Fe^{+2}) pentacovalente en su forma deoxigenada (unido a los 4 nitrógenos de la protoporfirina IX y un nitrógeno de la histidina proximal) y hexacovalente cuando está unido al O_2 (**figura 7-7**).

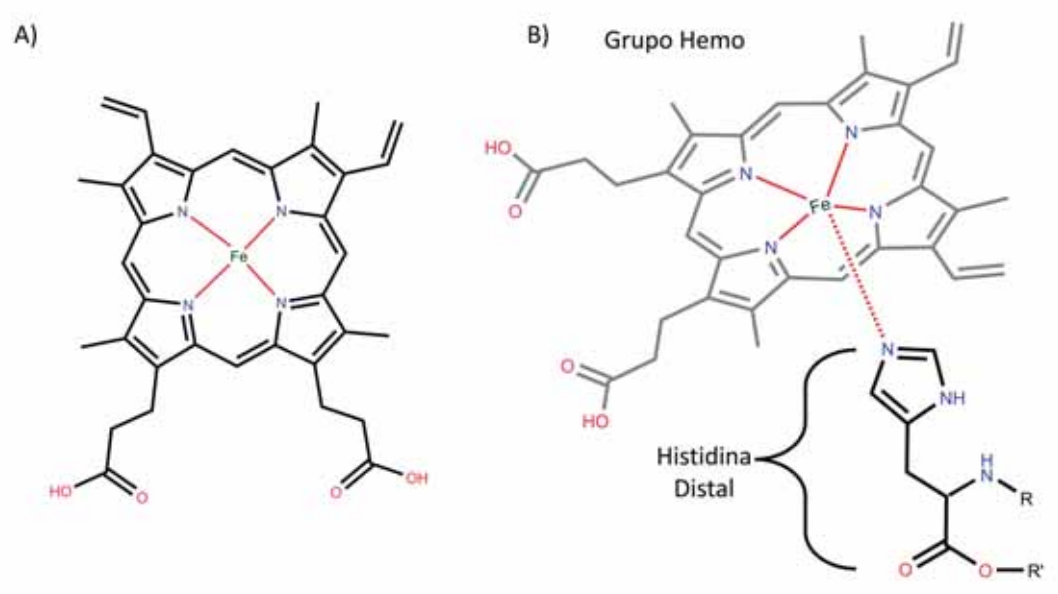


Figura 7-7. Estructura del grupo hemo. A) El grupo hemo está formado por una estructura de protoporfirina IX más el hierro ferroso, unido por cuatro enlaces covalentes a los nitrógenos pirrólicos. B) El grupo hemo está inserto en las cadenas globinas de manera coordinada con la histidina proximal (F8), uniéndose covalentemente con un nitrógeno del grupo imidazol.

El hemo es fundamental para la función de todas las células aeróbicas. Además de ser el grupo prostético de la Hb, lo es también de los citocromos mitocondriales que realizan el transporte de electrones, de los citocromos microsomales comprometidos en una variedad de reacciones que metabolizan drogas, de la catalasa que descompone el peróxido de hidrógeno, de la peroxidasa que reduce al peróxido y de la triptófano pirrolasa que cataliza la oxidación del triptófano.

b) Biosíntesis del Hemo

La mayor parte de los tejidos pueden sintetizar el hemo. Sin embargo, el 85% del hemo se sintetiza en la médula ósea eritropoyética, mientras que la mayor parte del resto ocurre en el hígado. En el hígado, la mayoría del hemo sintetizado se incorpora al citocromo P_{450} microsomal, que realiza la importante biotransformación de una gran variedad de químicos, carcinógenos, esteroides, vitaminas, ácidos grasos y prostaglandinas.

La vía de biosíntesis del hemo involucra 8 enzimas, 4 de ellas son citoplasmáticas y las otras 4 mitocondriales (Figura 7-8). Se pueden mencionar 8 hitos bioquímicos: 1) formación del anillo monopirrólico, 2) formación del profobilinógeno (PBG), 3) ensamblaje de 4 anillos monopirrólicos en un tetrapirrol lineal, 4) Ciclación asimétrica del tetrapirrol, 5) formación del coproporfirinógeno tipo

III, 6) formación del protoporfirinógeno IX, 7) formación de la porfirina IX y 8) inserción del hierro a la protoporfirina IX. El primero, sexto, séptimo y octavo pasos ocurren en la mitocondria. El resto, en el citosol.

Los intermediaros más importantes de esta vía son las protoprofirinas, caracterizadas por ser incoloras y sensibles a la luz, las cuales se acumulan y oxidan a porfirinas en déficits genéticos de las enzimas de esta vía sintética, generando las enfermedades denominadas **porfirias**. La única oxidación fisiológica de las protoporfirinas ocurre en la formación de porfirina IX. A continuación, se describen las etapas de la biosíntesis del hemo en células eritroides:

1) Formación del anillo monopirrólico: se inicia en la mitocondria con la condensación de glicina con succinil CoA para formar el ácido δ-5 aminolevulínico (ALA), reacción catalizada por la enzima **Aminolevulínico sintasa 2 (ALAS2)**. La ALAS2 es un homodímero que reside en la matriz de la membrana mitocondrial interna de los precursores eritroides, con absoluta especificidad por la glicina, pero con baja afinidad. Es la enzima limitante de la síntesis del Hemo y, por lo tanto, la enzima más altamente regulada de la vía. El segundo sustrato, succinil CoA, es un intermediario del ciclo de Krebs y es el que provee la energía para la compleja vía de la biosíntesis de porfirina. La enzima requiere de piridoxal fosfato (vitamina B6) como cofactor. El hemo regula a la ALAS2 por disminución de la vida media del mRNA, bloqueo de la traducción, a través del bloqueo en la translocación del precursor proteico de ALAS2 dentro de la mitocondria e induce su degradación. Se sabe que el mRNA de ALAS2 contiene un IRE (elemento de respuesta a hierro) en el sector 5'UTR, donde una proteína IRP (proteína de unión a IRE) se une frente a un déficit de hierro, impidiendo la síntesis de ALAS2. La deficiencia genética de ALAS2 genera anemia sideroblástica ligada al X, ya que su ubicación genómica es en Xp11.21. La otra isoenzima de ALAS, la ALAS1, es expresada ubicuamente en todas las células del organismo, siendo especialmente importante en hígado y está codificada en el cromosoma 3.

2) Formación del PGB: a través de la condensación de dos ALA, en un paso catalizado por la **Ácido aminolevunílico deshidratasa (ALAD)** o **PGB sintasa** en el citosol. Está compuesta por 8 subunidades de 36 kDa y contiene 4 sitios catalíticos. La enzima requiere zinc (un átomo por subunidad) y grupos sulfidrilos intactos para la actividad, por lo que puede ser inhibida por metales pesados como el plomo. Es la enzima más abundante en la síntesis del hemo y por lo tanto incapaz de jugar un rol regulador

3) Ensamblaje de 4 PGBs en un tetrapirrol lineal: los dos pasos enzimáticos siguientes convierten a cuatro moléculas de PBG en un tertrapirrol lineal, el hidroximetilbilano, a través de la enzima llamada **Porfobilinógeno desaminasa (PBG-D) o Hidroximetilbilano sintasa (HMBS) o uroporfirinógeno I sintetasa.** La enzima tiene 35-40 kDa. En humanos el gen de PBG-D tiene dos isoformas, uno exclusivo de células eritroides.

4) Ciclación asimétrica del tetrapirrol: A continuación, se realiza la ciclación del hidroximetilbilano en el citosol, para formar una estructura en anillo llamada uroporfirinógeno tipo III, de carácter asimétrico. Esto es catalizado por la enzima **Uroporfirinógeno III cosintasa (UROS)**, la cual impide que el hidroximetilbilano cicle espontáneamente en uroporfirinógeno tipo I, de estructura simétrica. La URO-S cataliza la única reacción en que el anillo es invertido y la cadena es ciclada, proporcionando el isómero tipo III. La deficiencia genética homocigota de UROS produce la porfiria eritropoyética congénita o enfermedad de Günther, acumulándose las porfirinas tipo I.

5) Formación del coproporfirinógeno tipo III: ocurre en el citosol, con la descarboxilación del uroporfirinógeno tipo III, formando el coproporfirinógeno tipo III. Esto es Catalizado por la **uroporfirinógeno descarboxilasa (URO-D).** La URO-D cataliza la descarboxilación secuencial de 4 moléculas de acetato de las cadenas laterales del uroporfirinógeno III, formando el coproporfirinógeno III, que posee ahora 4 grupos metilo. Esta enzima no requiere cofactor, pero sí necesita grupos tioles para la actividad enzimática. Su deficiencia genética heterocigota genera la porfiria cutánea tarda, mientras que la homocigota genera la porfiria hepatoeritropoyética.

6) Formación de la porfirina IX: la enzima **Coproporfirinógeno oxidasa (CPO)** cataliza en este paso, la descarboxilación oxidativa de 2 de los 4 grupos propiónicos (ácidos) en las posiciones 2 y 4 del coproporfirinógeno III y dejando dos nuevos grupos vinílicos. La CPO está localizada en el espacio intermembranoso mitocondrial, probablemente en asociación con la cara externa de la membrana interna, pero existe poca información sobre el mecanismo por el cual el coproporfirinógeno III atraviesa la membrana externa. La coproporfiria hereditaria es producida por la deficiencia genética parcial de CPO.

7) Formación de la protoporfirina IX: se produce por la acción de la **Protoporfirinógeno oxidasa (PPO).** Esta es una proteína integral de la membrana mitocondrial interna con el sitio activo en el espacio intermembranoso. La PPO cataliza el último paso en la vía del hemo, removiendo 6 átomos de hidrógeno del anillo porfirinógeno, trasformándolo a una profririna (oxidada). La porfiria variegata es causada por el déficit parcial de esta enzima.

8) Inserción del hierro a la protoporfirina IX: el paso final incluye la inserción de un átomo de Fe^{+2} en la protoporfirina IX por la **Ferroquelatasa (FECH)**, etapa que ocurre en la mitocondria. Esta enzima también llamada Hem-sintetasa o Protohem ferro-liasa, tiene 2 sustratos: protoporfirina IX y hierro férrico y dos productos: el hemo (tipo B) y $2H^{+}$. La proteína madura está sujeta a la membrana mitocondrial interna con el sitio activo localizado en la matriz. La enzima activa es probablemente un monómero, aunque se ha sugerido que funciona como un homodímero 80 kDa. La protoporfiria eritropoyética se debe al déficit parcial de FECH.

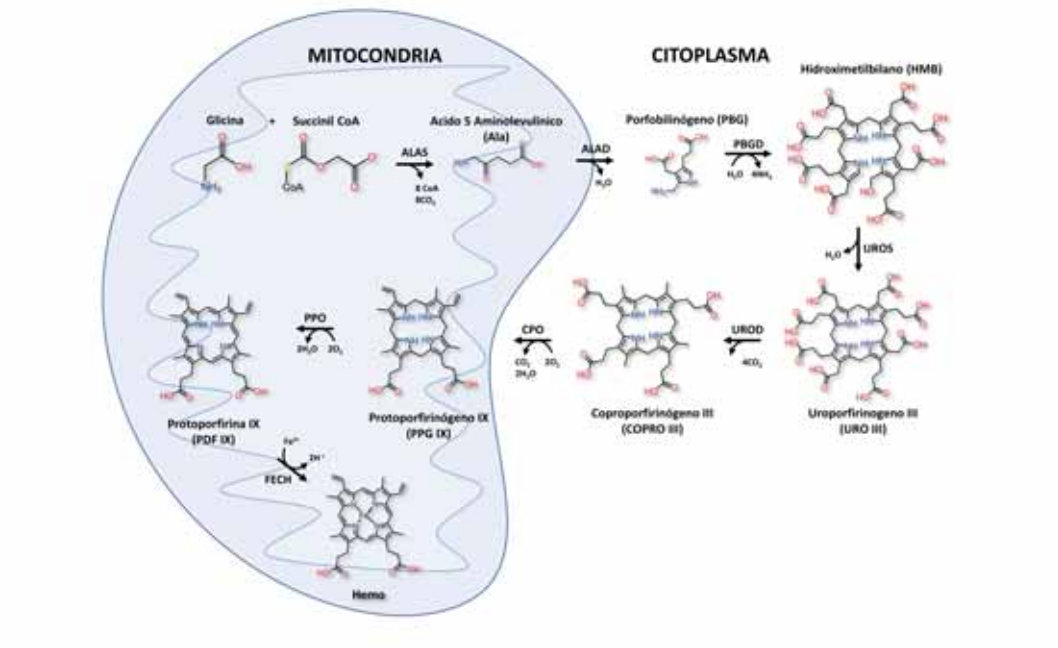


Figura 7-8. Biosíntesis del grupo Hemo. Parte del proceso ocurre en el interior de la mitocondria y otra en el citosol. Para la descripción de sus 8 reacciones enzimáticas, ver texto.

c) Interacciones del hemo con la globina

Estudios de cristalografía de rayos X de alta resolución, han suministrado información precisa acerca de los detalles de la interacción entre el hemo y las cadenas globina. El hemo se encuentra insertado en una hendidura entre las hélices E y F. El hierro está ligado covalentemente a un nitrógeno imidazólico de la histidina proximal F8, mientras que no con la histidina distal E7, pero el nitrógeno épsilon imidazólico de esta última, estabiliza la unión al O_2, ya que establece un puente de hidrógeno con el segundo oxígeno de este gas. Estos residuos de histidina son una característica invariable de todas las globinas de los vertebrados normales. Hemoglobinopatías estructurales encontradas por mutación de la histidina proximal incluyen: Hb Mozhaisk (ß92, His→Arg), Hb M-Hyde Park (ß92 His→Tyr), Hb New Castle (ß92 His→Pro), Hb Saint Etienne (ß92 His→Gln) y Hb J-Altgeld Gardens (ß92 His→Asp). Las hemoglobinopatías estructurales encontradas por mutación de la histidina distal incluyen: Hb Zurich (ß63 His→Arg), Hb M-Saskatoon (ß63 His→Tyr), Hb Bicêtre (ß63 His→Pro).

El residuo del aminoácido hidrofóbico valina E11 cierra el acceso del O_2 al bolsillo hidrofóbico del hemo en la cadena ß. Este también corresponde a un residuo que es considerado invariable y que aparece sustituido en algunas hemoglobinopatías inestables y metahemoglobinas, como son: Hb M-Milwaukee-I (ß67 Val→Glu), Hb Bristol (ß67 Val→Asp), Hb Alesha (ß67 Val→Met), Hb Sydney (ß67 Val→Ala), Hb Manakau (ß67 Val→Gly). Además de las uniones descritas, el hemo está ligado a la globina por dos puentes de hidrógeno que unen los grupos propiónicos (ácidos) de las cadenas laterales de la porfirina a los segmentos FG y

GD y a la hélice H, pero la unión más fuerte está asegurada por un gran número (aproximadamente 80) de uniones hidrofóbicas. Al unirse a la globina, el hemo adquiere solubilidad, asegurándose además un ambiente hidrofóbico, necesario para captar de forma reversible el O_2.

En este sentido, la secuencia es la siguiente: la primera molécula de O_2 que se une a la Hb, lo hace a una cadena α, ya que la valina E11 está cerrando el paso en la cadena ß. Al ingresar el O_2, este fuerza al Fe hemínico a acercarse, tirando a su vez a la histidina F8 que se encuentra justo en el mismo eje del O_2, pero debajo del hemo. Esto induce que el grupo hemo pase de un estado "abovedado" a un estado más plano (Figura 7-9). Así, un sector de la hélice F y de la G de la misma cadena α, que interactuaban con la hélice C de la otra cadena ß (interacción FG-C), dejan de hacerlo, de manera que la cadena ß sufre un cambio conformacional, con ruptura de puentes salinos de los extremos carboxilos de las 4 cadenas globínicas. Este cambio, favorece la llegada de la segunda molécula de O_2, ya que el número de enlaces débiles que se deben romper para su unión, será menor. Este mecanismo es, en términos generales, el que se cree como principal responsable del efecto de cooperatividad ya descrito (Figura 7-6). Como se desprende del análisis estructural señalado, la incorporación del O_2 a la molécula de Hb desencadena una profunda alteración en la conformación de la molécula, lo que implica la cooperatividad entre las subunidades. Es decir, la transición de la estructura cuaternaria desoxigenada a la oxigenada afecta al medio ambiente de los hemo no ligados, de tal forma que la afinidad por el O_2 se incremente.

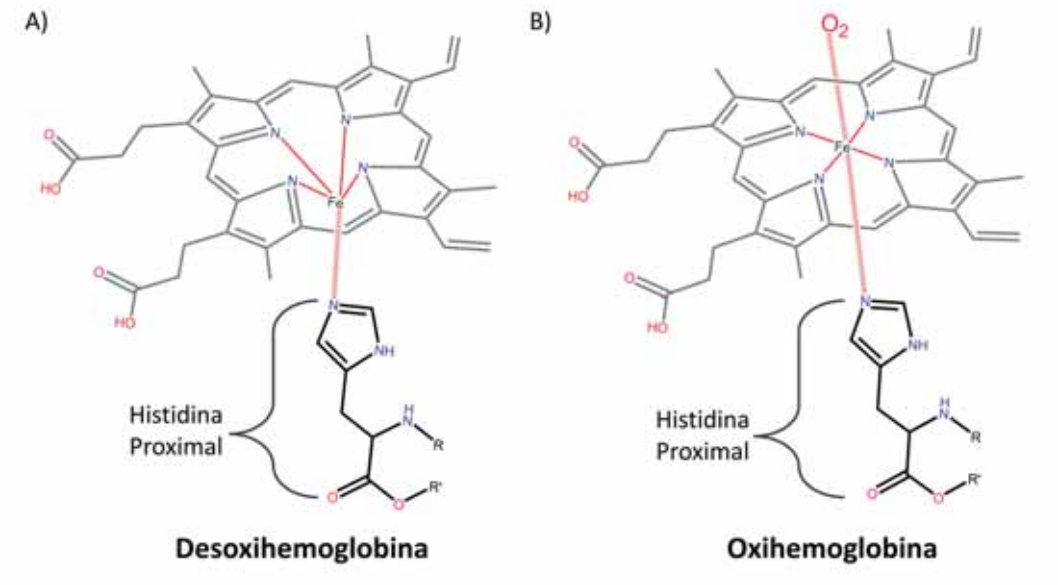


Figura 7-9. Cambios en la estructura del grupo hemo. A) El grupo hemo en la desoxihemoglobina se encuentra en una forma "abovedada", inducida por su enlace con la histidina proximal F8. B) El grupo hemo al unirse al O_2, es atraído y levantado por este a través de su hierro hemínico, adoptando una estructura "planar", tirando a su vez de la histidina F8. Estos cambios se asocian con modificaciones estructurales en las cadenas globinas que producen como resultado, el efecto de cooperatividad positiva en la unión a los siguientes O_2 en las restantes cadenas.

2.1.3 Tipos de hemoglobinas

a) Hemoglobinas normales del adulto y neonato

Hemoglobina A_0 (α2ß2)

Tanto las hemoglobinas A_0 como la A_2 son las hemoglobinas más intensamente estudiadas. La Hb A constituye aproximadamente el 97% de toda la Hb del adulto, mientras que en el recién nacido su cuantía es del 20-40%. Su estructura ya ha sido descrita en los puntos anteriores, por lo que se describirá la A_2 a continuación.

Hemoglobina A_2: ($\alpha_2\delta_2$)

En el neonato representa menos del 0,5% del total de Hb, mientras que en el adulto representa entre el 0,3% y el 2,6%. Dichos valores dependen, en parte, del método empleado para su cuantificación, siendo ligeramente menores cuando se usa el sistema de buffer Tris. Su estructura es muy homogénea, debido a que las cadenas α y δ de la Hb tan solo difieren en 10 de los 146 aminoácidos que componen la secuencia primaria de la cadena. En vista de su baja cantidad en los glóbulos rojos, la Hb A_2 no posee virtualmente ningún papel fisiológico específico en el transporte de O_2. Sus propiedades de unión al O_2 simulan aquellas de la Hb A_0, teniendo similar afinidad por el O_2, cooperatividad entre subunidades, efecto Bohr y respuesta al 2-3 DPG. No obstante, la Hb A_2 es más resistente a la desnaturalización térmica que la Hb A. Esto puede explicarse por un contacto adicional en la interfase α_1-δ_1, lo cual confiere aumento de la estabilidad al dímero αδ. La aparente falta de un papel fisiológico para la Hb A2 es compatible con mayores diferencias en la estructura primaria entre las cadenas δ de primates comparado, con las cadenas ß. Así, ciertas mutaciones que en forma significativa alteran la función o estabilidad de la Hb A, podría ser tolerado en la Hb A_2, pero no en el componente responsable del transporte de la mayor parte del O_2.

A pesar de su prácticamente nula relevancia fisiológica, la determinación de Hb A_2 sí es clínicamente relevante. Esto es debido a que se encuentra aumentada en forma congénita en las ß-talasemias, que son enfermedades genéticas hereditables donde la síntesis de Hb se encuentra disminuida y/o alterada por defectos en la cadena ß. Así, tenemos un aumento de HbA_2 en pacientes con S/ß-talasemia (defectos en la calidad y cantidad de la cadena ß, por causas genéticas, generando Hb S falciforme) así como S/S (Hb S falciforme) y A/S (esta última involucra también a defectos en la cadena α y presencia de Hb S). También en algunas enfermedades adquiridas como en la anemia megaloblástica, el hipertiroidismo y la malaria. Por otra parte, se encuentra disminuida en estados de carencia de hierro, anemias sideroblásticas, α-talasemias, δß-talasemias, δ-talasemias y persistencia hereditaria de Hb fetal (PHHF). Lo que explicaría este aumento en las talasemias y defectos asociados a la cadena ß y disminución en α talasemias, sería que las cadenas α se combinan más fácilmente con las cadenas ß que con las δ, por lo que tendrá más posibilidad de formarse la unión α-δ en las ß-talasemias y en homocigotos S/S y menos en las α-talasemias.

b) Hemoglobinas fetales

Las Hbs fetales son aquellas que se producen durante la etapa fetal del desarrollo y tienden a disminuir y quedar en niveles muy bajos durante el primer año de vida. Tiene como función, transportar el O_2 recibido desde la sangre de la madre y distribuirlo a través de los propios glóbulos rojos del feto. El descubrimiento hecho por Körber en 1866 de que los hemolizados de glóbulos rojos de recién nacidos eran resistentes a la desnaturalización por álcali, sugería que estas células contenían una Hb estructuralmente distinta. Esta conclusión fue reforzada por la demostración que la Hb de un neonato tiene un aumento de la absorbancia en el espectro ultravioleta, un hallazgo que hoy en día se sabe que se debe a un residuo adicional de triptófano en la cadena γ. El desarrollo de técnicas cromatográficas y electroforéticas, permitió el aislamiento y caracterización de la Hb fetal humana (Hb F). Análisis más precisos de la Hb fetal purificada, sugirieron que era un tetrámero con dos subunidades idénticas en común con la Hb A_0 (las cadenas α), mientras que las otras dos subunidades tienen una estructura diferente, siendo esta la γ, codificada en el cromosoma 11.

La estructura primaria de la cadena γ humana fue determinada por Walter Schroeder y cols. La secuencia aminoacídica de la cadena γ de la Hb humana es muy similar a la de la cadena ß, difiriendo en 39 de 146 residuos. De estos, 22 residuos están en la superficie externa de la molécula y es, por lo tanto, improbable que tengan algún efecto funcional significativo sobre las propiedades de la Hb F, fuera de la diferente carga eléctrica. Las sustituciones internas están conservadas, involucrando a aminoácidos de polaridad similar. Cuatro sustituciones ocurren en la interfase α_1-γ_1, las que probablemente explican el aumento de la estabilidad de la Hb F y la disminución de la disociación en monómeros. En contraste, ninguna sustitución ocurre en la interfase α_1-γ_2 cuya movilidad, como ya vimos para el caso de α_1-$ß_2$ en la Hb A_0, es muy importante para el efecto de cooperatividad entre las subunidades. La Hb F es la forma dominante de Hb en la etapa fetal, comenzando a producirse entre las 10 y 12 semanas de gestación y culminando hacia los 6 meses de vida. Tiene dos tipos de heterogeneidad estructural: genética y post-traduccional. La heterogeneidad química de la Hb F humana fue descubierta en 1968 cuando se observó que la Hb F contenía una mezcla de dos tipos de cadenas γ que diferían solamente en la presencia de un residuo de glicina (cadena Gγ, gen *HGB2*) o un residuo de alanina ($A\gamma^{I}$, gen HGB2) en la posición 136. Las cadenas Gγ (75%) y $A\gamma^{I}$ (25%) son los productos de genes no alélicos, los cuales están relacionados a los genes δ y ß. Como vimos en este capítulo, la disposición del "cluster" del gen de las cadenas no α es: 5´ - ε - Gγ - Aγ - δ - ß - 3´ (Figura 7-3), en el cual ε representa el gen que produce la cadena embrionaria ε. Así, los niños recién nacidos producen una mezcla de dos tipos de Hb F. El componente mayor también denominado F_0, es un tetrámero del tipo $\alpha_2G\gamma_2$, que comprende la mayoría de la Hb total. Una porción de Hb F menos abundante (F_1) y con un punto isoeléctrico menor (carga más negativa) difiere de la Hb F principal en que el tetrámero está compuesto por $\alpha_2A\gamma^{I}_2$. Un segundo y más importante tipo de heterogeneidad estructural de la Hb fetal, se origina de la presencia de diferentes genes que codifican para la cadena γ.

La proporción de Gγ/Aγ^{I} de 3/1 es constante a través del desarrollo fetal. En contraste a esto, la pequeña cantidad de Hb F en los glóbulos rojos del individuo adulto (<2%), contienen alrededor de 40% de Gγ y 60% de Aγ^{I}. La transición del cociente fetal de Gγ/Aγ ^{I} al del adulto ocurre en los primeros diez meses de vida. Más recientemente, se ha documentado otra importante heterogeneidad de cadena γ: en la Hb F de alrededor de 30% de los recién nacidos blancos y 20% de los negros, una minoría de cadenas Aγ^{I} (aproximadamente 18%) tienen treonina en vez de isoleucina en la posición 75. En un número pequeño de homocigotos, esta subunidad γ compone alrededor del 30% del total de la Hb fetal del recién nacido. Esta sustitución reside exclusivamente en la cadena Aγ, de tal forma que esta subunidad ha sido designada como Aγ^{T} y es, en términos estrictos, una variante estructural de Aγ.

Desde el punto de vista funcional, la Hb F tiene una mayor afinidad por el O_2 que la Hb A_0. Esto es, por una parte, a consecuencia de la mucha menor afinidad de la Hb F para unirse al 2-3 difosfoglicerato (2-3 DPG), un metabolito intermediario producido frente a bajos niveles se ATP y a pH ácidos, que favorece la descarga de O_2 desde la Hb hacia los tejidos, si lo comparamos con la afinidad que presenta la Hb A_0. Al tener mucha menor afinidad hacia el 2-3 DPG, le confiere a la Hb F una ventaja funcional en la captación de O_2 a presiones bajas (pO_2 de 45 mm Hg), como sucede en el intercambio placentario. Además, la presión parcial de O_2 para el 50% de saturación es de 19 mm Hg para la Hb F, menor si comparamos con los 27 mm Hg de la Hb A. Todo esto indica su mayor afinidad al O_2 y explica su abundancia en la etapa fetal.

Los niveles de Hb F en el adulto se sitúan por debajo del 2%, por acción de los genes represores *BCL11A* y *ZBTB7A*, que codifican para proteínas con dedos de zinc que se unen a las secuencias promotoras de los genes de las cadenas γ, inhibiendo su expresión. Sin embargo, el desarrollo de métodos más sensibles y específicos como la cromatografía líquida de alta presión (HPLC), han demostrado que dichos niveles son ligeramente superiores en adultos aparentemente normales. La Hb F en el adulto no se distribuye homogéneamente en la sangre, sino que se encuentra en un reducido número de eritrocitos, llamados glóbulos rojos F. Estos niveles se ven incrementados notablemente en algunos trastornos hereditarios tales como: ß-Talasemias, síndrome de persistencia hereditaria de heoglobina fetal (PHHF), en las hemoglobinopatías S, E y C homocigotas y en trastornos adquiridos como en la anemia megaloblástica, aplasia medular, algunas leucemias y tumores y durante el embarazo fisiológico.

Un aspecto clínico relevante de la Hb F es que sus niveles aumentan en los adultos en la anemia de células falciformes. En esta enfermedad, una mutación en la cadena ß hace que la Hb S se agregue al deoxigenarse, deformando al eritrocito, el cual adquiere una forma de hoz, produciendo hemólisis y alteración en la circulación sanguínea. En esta condición, los niveles de Hb F pueden llegar hasta el 20% de la Hb total. Se piensa que esto se debe en gran parte a que, al parecer, la Hb F tiende a inhibir la agregación de la Hb S. En efecto, niveles elevados de Hb F en pacientes con anemia de células falciformes presentan una disminu-

ción en la frecuencia y duración de las crisis dolorosas, de infecciones asociadas a eventos trombóticos y mejora la anemia. Fármacos como la hidroxiurea y la 2-desoxi-5 azacitidina incrementan los niveles de Hb F, lo que constituye una opción de tratamiento en estos pacientes, aunque los mecanismos celulares asociados se desconocen aún.

Hemoglobina de Bart (γ^4)

Se encuentra en cantidades menores del 2% en los neonatos normales. Es un tetrámero γ (γ^4) funcionalmente anómalo, mostrando una afinidad por el O_2 muy aumentada, ausencia de interacción hemo-hemo y de efecto Bohr. Se encuentra aumentada como respuesta a un déficit de cadenas α en los recién nacidos con α-talasemia, siendo una de las formas más severas de esta, ya que se puede asociar a hidropesía fetal no inmunológica, el cual cursa con edema fetal generalizado, derrames pleural y pericárdico y una anemia hipocrómica grave, con desenlace casi siempre mortal.

c) Hemoglobinas embrionarias

En 1961, Huehns y colaboradores descubrieron dos hemoglobinas en la sangre de embriones humanos y diferentes a la Hb A y a la Hb F. Estos componentes migraban más lentamente que la Hb A_2 al ser estudiados con electroforesis a pH alcalino (8,6). Se las designó como Hb **Gower 1** y **Gower 2**. Posteriormente, Capp y colaboradores describen una tercera Hb embrionaria, la cual tiene un movimiento electroforético similar a la Hb A_0 a pH de 8,6, pero se separa de esta a pH ácido y que denominaron **Hemoglobina Portland I**. Mientras los componentes menores de esta, **Portland II** y **III** fueron descubiertas más tardíamente. La estructura de las hemoglobinas embrionarias, como se vio en la tabla 7-1 y en la figura 7-3, es la siguiente:

Gower 1 (Hb E1). Es un tetrámero compuesto completamente de subunidades embrionarias, $\zeta_2\varepsilon_2$. Corresponde al componente mayor de las hemoglobinas embrionarias.

Gower 2 (Hb E2). Es un tetrámero compuesto de dos cadenas α y dos cadenas ε ($\alpha_2\varepsilon_2$). Las cadenas ε son codificadas por un gen localizado en el "clúster" génico de ß-globina en el cromosoma 11. El gen ε está localizado en el lado 5´ del gen $G\gamma^{20}$. Corresponde al componente menor de las hemoglobinas embrionarias.

Hemoglobina Portland I (Hb E3). Es un tetrámero compuesto de dos cadenas γ y dos cadenas ζ. La cadena ζ muestra una fuerte homología estructural con la cadena α. El gen que la codifica, se encuentra situado en el lado 5´ de los genes de la cadena α en el cromosoma 16. Respecto a la Hb A_0, la Hb Portland I tiene una mayor afinidad por el O_2 que la Hb A_0, menor cooperatividad entre subunidades y un efecto Bohr de aproximadamente la mitad.

Estas tres hemoglobinas embrionarias recién señaladas: $\alpha_2\varepsilon_2$, $\zeta_2\varepsilon_2$ y $\zeta_2\gamma_2$ funcionan también como transportadores fisiológicos de O_2. Los glóbulos rojos de los embriones en los cuales estas tres hemoglobinas predominan, tienen una afinidad por el O_2 similar a la de los eritrocitos de la sangre de cordón y una curva de disociación de O_2 sigmoidea indicativa de que también existe el fenómeno de cooperatividad entre las subunidades. El efecto Bohr en los glóbulos rojos embrionarios es similar al de los fetales. Las hemoglobinas embrionarias pueden ser fácilmente detectadas por isoelectroenfoque y por técnicas cromatográficas, aunque la separación de la Hb Portland I y Hb A_0 es difícil.

2.1.4. Ontogenia de la hemoglobina humana

Como vimos, las hemoglobinas que predominan durante el período embrionario son las **Gower 1**, **Gower 2** y **Portland I**. Se ha visto en los embriones más jóvenes (examinados a los 37 días de gestación) que la proporción de hemoglobinas Gower 1 y 2 son del 42% y 24%, del total, respectivamente y el resto es Hb F. En etapas posteriores, la proporción de Hb Gower desciende hasta casi ser indetectable en la 10^a-12^a semana de gestación. El período en el cual aparece y desaparece la Hb Portland I ha sido más difícil de determinar, ya que su migración en gel de almidón es muy similar a la Hb A_0, siendo observada en electroforesis de agar citrato. En los fetos normales a la 10^a semana de gestación se observa un 20% de Hb Portland del total de la Hb.

La Hb F aparece precozmente durante la gestación, siendo el 30% del total a los 37 días de gestación y del 90% hacia la 8^a-10^a semanas, permaneciendo así hasta poco antes del parto. Ambas cadenas tanto γ como α, se sintetizan desde el principio del embarazo y su relación es de aproximadamente 3/1, permaneciendo de esta manera de forma constante. A los seis meses de vida extrauterina, la cantidad de Hb F es menor del 1% aunque en niños normales pueda encontrarse con frecuencia niveles del 2-5%, para posteriormente situarse al año en valores menores del 1% que mantendrá durante toda la vida.

La Hb A_0 en cuantía del 5-10% se detecta en fetos normales desde la 6^a semana de gestación en adelante, aunque electroforéticamente no sea demostrable hasta la 12^a semana de vida. Pequeñas cantidades de cadena ß pueden comprobarse por el estudio de síntesis de globinas antes de la 6^a semana de gestación; posteriormente se observa un ligero incremento en la síntesis de la cadena ß (hacia la 12^a-20^a semana), proporción que permanece constante hasta iniciarse la síntesis de Hb A_0, de forma más notoria.

La Hb A_2 aparece en último lugar, se comienza a producir en el tercer trimestre de la gestación, detectándose solamente trazas de Hb A_2 en la sangre del cordón umbilical en el momento del nacimiento. Su síntesis se va incrementando a lo largo de los 6-12 primeros meses de vida hasta alcanzar los niveles definitivos.

Por todo lo anteriormente señalado, se entiende cómo el déficit o anomalía de las cadenas α se manifiesta mejor en el período neonatal. Después del parto, la

síntesis de cadenas ß va aumentando y, puesto que la afinidad de las cadenas α es mayor por las cadenas ß que por las γ, las cantidades de Hb Bart (γ^4) se cuantifican mejor en el neonato que en el adulto. Además, como la cadena α forma parte también de las hemoglobinas Gower 2, Hb F, Hb A_0 y Hb A_2, la síntesis defectuosa de la cadena α se va a manifestar en todas las etapas del desarrollo. En la figura 7-10 se muestra cómo va cambiando el patrón de expresión de las cadenas globinas desde la gestación, dando lugar a las distintas hemoglobinas. En cuanto a las variantes estructurales de cadena α que pueden aparecer, van a tener el mismo porcentaje de Hb anómala en el período neonatal que en el adulto, mientras que las de cadena ß, se van a manifestar más claramente durante el período de adulto, y por último, las variantes de Hb F (cadena γ) se detectan mejor en el periodo neonatal, desapareciendo en la vida adulta.

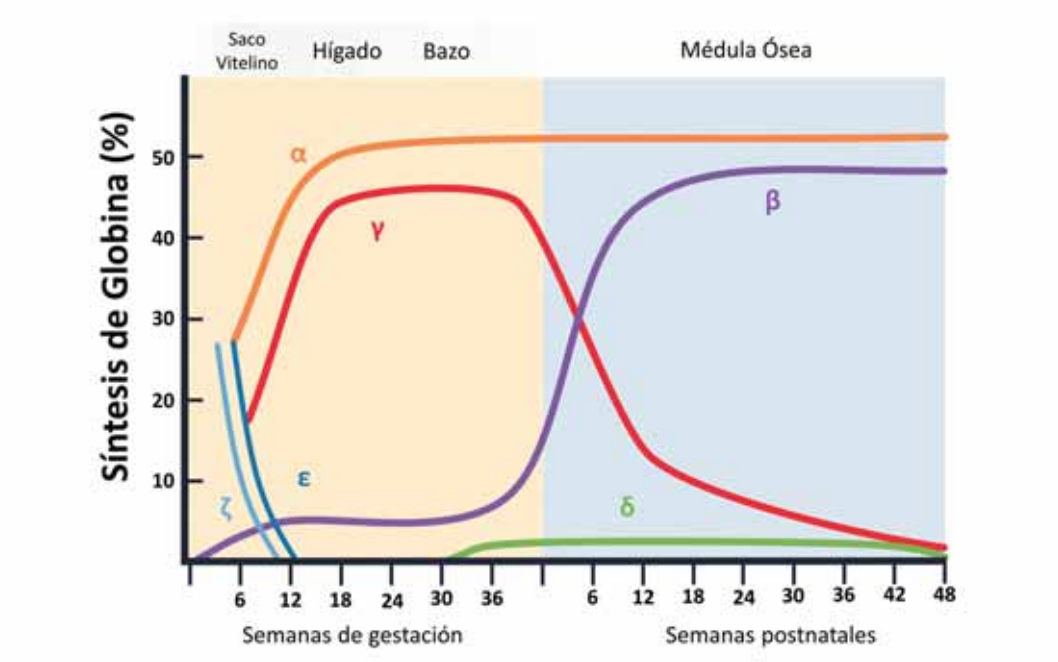


Figura 7-10. Esquema de la temporalidad en la expresión de las cadenas globinas durante el desarrollo humano.

2.2. Función de la hemoglobina

La Hb tiene como funciones el transporte del O_2 desde los pulmones a los tejidos, el traslado del CO_2 desde los tejidos a los alvéolos pulmonares y actúa además, como sistema tampón sanguíneo.

2.2.1. Transporte de oxígeno

A nivel del mar, el aire que respiramos contiene 20,95% de O_2. La tensión de O_2 ambiental (pO_2) a nivel del mar en el aire seco es aproximadamente el producto del porcentaje de O_2 por la presión atmosférica a ese nivel: 0,2095 x 760 mm

Hg ó 160 mm Hg. A medida que el aire pasa por la vía aérea superior, llega a saturarse completamente con agua. Dentro de las vías aéreas y pulmones, el aire inspirado se mezcla tanto con el gas del espacio muerto y el gas alveolar que permanentemente está siendo alterado por captación de O_2 y liberación de CO_2 desde la sangre que pasa a través de los capilares pulmonares. Así, la pO_2 en el aire alveolar cae hasta alrededor de los 95 mm Hg.

La cantidad de O_2 transportado a través de la membrana alveolar por unidad de tiempo, es un producto entre la capacidad de difusión de la membrana por unidad de tiempo y la diferencia de pO_2 entre el gas alveolar y la sangre del capilar pulmonar. Esta membrana es de alrededor de 0,2 µm de grosor y consiste en surfactante, epitelio alveolar, membrana basal, tejido intersticial y endotelio capilar. El O_2 es transportado pasivamente a través de la membrana del capilar alveolar. En el tejido pulmonar normal, la resistencia al movimiento del gas a través de esta membrana es prácticamente despreciable. Un factor que contribuye levemente a crear un gradiente de O_2 alvéolo-capilar es el tejido pulmonar, incluyendo macrófagos metabólicamente activos que captan O_2 directamente del gas alveolar. La expulsión de CO_2 en la circulación pulmonar resulta en un aumento en el pH intracelular. Debido al efecto Bohr, la afinidad por O_2 de la Hb aumenta en estas condiciones, facilitando el transporte de O_2 al glóbulo rojo.

La sangre de los capilares pulmonares se mezcla con la sangre de las venas bronquiales, pleurales y venas de Tebesio (venas cardíacas menores). En condiciones normales, este "shunt" produce una caída de la pO_2 en las venas pulmonares a 90 mm Hg. Esta presión parcial de O_2 se mantiene hasta que la sangre alcanza las arteriolas. La difusión de O_2 dentro y fuera del eritrocito, es incrementada por la alta concentración intracelular de Hb. La membrana del glóbulo rojo no posee una barrera adicional, pero la capa de agua que circunda a la célula, retrasa la tasa de captación y liberación del O_2. Así, las tasas de oxigenación y desoxigenación de las suspensiones de glóbulos rojos son diez veces menores que una solución equimolar de Hb. Sin embargo, los tiempos de tránsito en los capilares pulmonares y periféricos son aproximadamente de cinco veces el tiempo medio que se requiere para realizar la oxigenación y desoxigenación. En un individuo normal y en reposo, el glóbulo rojo tarda alrededor de 0,75 s en transitar a través del lecho capilar pulmonar. Se ha estimado que el equilibrio con el gas alveolar se completa en 0,35 s.

2.2.2. Descarga de oxígeno a los tejidos

El transporte de O_2 a los tejidos está gobernado por tres variables independientes, las que pueden expresarse cuantitativamente en la **ecuación de Fick**:

$$VO_2 = 1{,}34 \times Q \times Hb \times (S_AO_2 - S_VO_2)$$

VO_2 es el volumen de O_2 liberado (L/min), **1,34** es el volumen (en mL) de O_2 unido por 1 g de Hb totalmente saturada, **Q** es el flujo sanguíneo (L/min), y **SAO_2**

y **SVO_2** son saturaciones de O_2 arterial y venosa mixta (%). En esta fórmula, la pequeña cantidad de O_2 disuelta en sangre no es considerada.

La concentración de Hb de la sangre es la resultante del balance entre eritropoyesis y destrucción de glóbulos rojos. El flujo sanguíneo a un tejido determinado está controlado por una compleja interacción de factores locales, neurales y hormonales.

El tercer factor en la ecuación de Fick, es **la diferencia entre la saturación de O_2 arterial y venosa mixta** (S_AO_2-S_VO_2), que es una expresión cuantitativa de la descarga fraccional de O_2 de la Hb durante el flujo de sangre desde la arteria a la vena. Este parámetro es dependiente de la curva de disociación del O_2 de la Hb de la sangre. En condiciones fisiológicas, la sangre está casi totalmente saturada de O_2 durante la circulación por los pulmones. Durante el flujo a través de los capilares sistémicos, la Hb permite una importante descarga de O_2 a pesar de una pequeña caída en la pO_2. Esto permite que el O_2 sea liberado en el plasma a concentraciones lo suficientemente altas como para mantener un gradiente adecuado al interior de las células (figura 7-6).

Además de los tres determinantes importantes expresados en la ecuación de Fick, otras variables a nivel tisular influyen en la descarga de O_2. En los capilares la tensión de O_2 plasmática es de alrededor de 1 mm Hg. menor que dentro del eritrocito. El gradiente de pO_2 entre el plasma y el interior de las células tisulares, depende de diversos factores independientes, incluyendo el patrón y densidad de los capilares, así como también su flujo relativo. Más aún, este gradiente está afectado por diferencias en la difusión de O_2 entre los tejidos y la afinidad por O_2 de las enzimas que utilizan O_2.

En la mayor parte de los tejidos, el transporte de O_2 en la célula está limitado por la capacidad de difusión. La transferencia de O_2 a través del protoplasma tisular es más rápida que a través de un grosor equivalente de H_2O. La musculatura cardíaca y esquelética tiene altas concentraciones de mioglobina dentro del citoplasma. Debido a su alta afinidad por O_2, esta proteína almacena O_2. La mioglobina también facilita el transporte de O_2 dentro de la célula. La pO_2 dentro de las células musculares del miocardio ha sido estimada en 5 mm Hg. Se requiere una pO_2 de alrededor de 0,5 mm Hg para el proceso de respiración mitocondrial. Si la tensión de O_2 cae bajo de 0,1 mm Hg, la respiración tisular cesa y sobreviene la muerte celular.

2.2.3. Mecanismo de carga de oxígeno

El cambio de la forma T (tensa) de la desoxihemoglobina a la R (relajada) de la oxihemoglobina, comprende una serie bien definida de modificaciones estructurales que incluyen la ruptura de las uniones que estabilizan la forma T, y la rotación relativa de la cadena ß sobre la α, que como ya vimos anteriormente, ocurre con abundancia de movimientos intramoleculares a nivel de la interfase α_1-$ß_2$. La porción C-terminal de las cadenas α y ß contribuye fundamentalmente

a la estabilidad de la forma T, pues la penúltima tirosina de ambas cadenas (α 140 y ß 145) está anclada en una hendidura entre las hélices F y H. En la cadena α, la arginina C-terminal participa en dos uniones salinas, en una el grupo guanidina de la arginina está unido a un aspartato (residuo 126) de la misma cadena α, y en otra, el grupo carboxilo puede unirse al grupo amino N-terminal de la otra cadena α.

El extremo C-terminal de la cadena ß juega un papel igualmente importante: así la histidina C-terminal (ß 146) constituye dos uniones salinas: su grupo carboxilo se liga al grupo Ɛ-amino de la lisina α 40, y su grupo imidazol forma una unión intra-subunidad con el carboxilo del aspartato ß 94. Así, por ejemplo, en la Hb Barcelona [ß94 (FG1) Asp→His] al romper esta unión salina, la estructura desoxi es menos estable, produciendo una afinidad aumentada y un efecto Bohr reducido.

La estructura cuaternaria de la desoxihemoglobina es mucho más estable que la forma oxi, debido a uniones iónicas inter e intra-subunidad cuya alta energía es liberada cuando el átomo de hierro realiza su desplazamiento de 0,6 Å hacia el plano del hemo al entrar el O_2 en la cavidad (**figura 7-9**). Dado que el hemo de la cadena α es más accesible para el O_2 que los de las ß, las α son oxigenadas primero, iniciándose en ellas los cambios conformacionales que conducen a la oxigenación de la molécula completa, rompiendo las cadenas ß posteriormente sus uniones con el 2-3 DPG y aproximándose estas tras la expulsión del fosfato orgánico.

2.2.4. Interacción hemo-hemo (cooperatividad)

Como se mencionó anteriormente en este capítulo, la entrada del primer O_2 en el interior del tetrámero de Hb, permite una captación más fácil de las siguientes moléculas de este gas, es decir, la incorporación de O_2 a una cadena aumenta la afinidad que por este gas tienen el resto de las cadenas que todavía no han reaccionado con él: esta es la base del denominado efecto **hemo-hemo o de cooperatividad**. Este mecanismo tan eficiente de transporte de O_2 no podría ser posible si no fuera por la naturaleza multimérica con enlaces débiles modificables de la Hb que da lugar a la forma sigmoide de la curva de disociación entre el O_2 y la Hb, producto del fenómeno de cooperatividad recién señalado. Si cada uno de los cuatro grupos hemo de la molécula de Hb se unieran al O_2 independientemente de los otros, la curva de disociación del O_2 sería de forma hiperbólica como la de la mioglobina, que además está compuesta de una sola subunidad como se mostró en la figura 7-6. Tal curva hiperbólica que presenta la mioglobina no es adecuada para el transporte de O_2, ya que al no existir cooperación hemo-hemo, se aprecia una gran afinidad por el O_2, lo que le incapacita para transportarlo, lo que realmente es su función opuesta al caso de la mioglobina que es el almacenamiento de O_2 en los tejidos. Para que la Hb cumpla con su papel fisiológico, debe ligar O_2 con una afinidad apropiada. Si la ligazón O_2-Hb fuera demasiado débil, la sangre no podría oxigenarse en la circulación pulmonar y si fuera muy fuerte, solo una escasa cantidad de O_2 sería descargada a los tejidos.

La afinidad del O_2 por la Hb es convenientemente expresada en términos de P_{50}, y corresponde a aquella tensión de O_2 en la cual la Hb está saturada al 50%. A mayor afinidad de la Hb por el O_2, menor será la P_{50} y viceversa. La P_{50} normal para la sangre humana en condiciones fisiológicas a pH de 7,4 y temperatura de 37°C es de 27 mm Hg. Existe un gran número de factores genéticos y medioambientales que afectan la afinidad de la Hb por el O_2 de la sangre humana. Los tres determinantes primarios de la afinidad son: temperatura, pH (asociado con la pCO_2) y 2-3 DPG intraeritrocitario (figura 7-12).

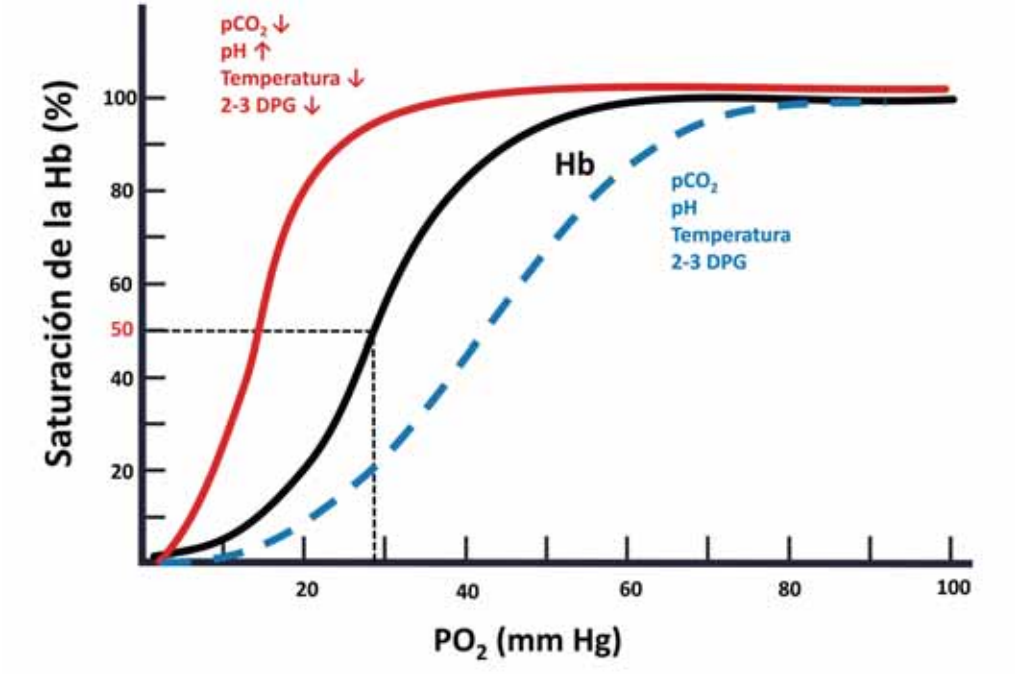


Figura 7-11. Factores determinantes en la curva de disociación de la Hb A_0.
Se indican los desplazamientos hacia la izquierda o hacia la derecha en relación con los cambios de pH, pCO_2, la concentración de 2-3 DPG y la temperatura.

a) Temperatura

La relación entre temperatura y afinidad por O_2 es un fenómeno apropiado desde el punto de vista fisiológico, ya que en condiciones de hipotermia relativa, las demandas metabólicas son comparativamente más bajas, por lo que se necesita menos O_2 hacia los tejidos y por tanto, la Hb puede mantener una alta afinidad debido a la desviación a la izquierda en la curva de disociación del O_2 y en consecuencia, menos cantidad de O_2 es liberado a los tejidos. A la inversa, si la temperatura aumenta, la desviación de la curva a la derecha resulta en una disminución de la afinidad por O_2 y así mayor descarga de O_2 hacia los tejidos, que tendrán mayor demanda metabólica. En individuos homeotermos, como es el caso del ser humano, solamente se permiten leves variaciones en la temperatura corporal, por lo que para que este fenómeno ($\Delta P_{50}/\Delta T$) sea fisiológicamente

importante, debe ser pronunciado. El mecanismo de este efecto se relacionaría con los cambios estructurales que el aumento de temperatura induciría sobre la hemoglobina, afectando a su unión con el O_2.

b) pH y CO_2: Efecto Bohr

Bohr, Hasselbach y Krogh, descubrieron que la afinidad de la Hb por el O_2 disminuye al aumentar las cantidades de CO_2. Estudios posteriores demostraron que este efecto era debido primariamente a una reducción en el pH. Esto se conoce hoy como **efecto Bohr** (figura 7-11). Los investigadores rápidamente dilucidaron el significado de estas observaciones. Concluyeron que un organismo liga y descarga O_2 y CO_2 recíprocamente: el O_2 es captado por los pulmones a medida que el CO_2 es expelido. En los tejidos periféricos ocurre el proceso inverso.

Debido al efecto Bohr, el intercambio de CO_2 facilita el intercambio de O_2 y viceversa. Sobre un rango de pH fisiológico, la P_{50} varía inversamente con el pH. Esto corresponde al denominado **efecto Bohr alcalino**. A medida que el CO_2 es expelido durante la circulación a través de los pulmones, hay un correspondiente aumento en el pH sanguíneo de esa zona y una disociación a la izquierda en la curva del O_2. De este modo, el relativo aumento en la afinidad por O_2 favorece la unión del O_2 a la Hb. A la inversa, a medida que la sangre circula a través de los capilares periféricos a los pulmones, el CO_2 entra al plasma y glóbulos rojos, acidifica el pH y se desfavorece la unión del O_2 a la Hb. Debido a la abundancia de **anhidrasa carbónica (AC)** en los glóbulos rojos, rápidamente se forma ácido carbónico. La ionización de este ácido débil provoca una disminución en el pH intracelular. Los hidrogeniones se unen a la Hb y afectan su afinidad por el O_2. Debido al efecto Bohr, la afinidad de la Hb por el O_2 disminuye, resultando en una mejoría en la descarga de O_2 a los tejidos. Así, el efecto Bohr permite un ciclo fisiológicamente apropiado para el trasporte de O_2 y CO_2 en el organismo. Lo opuesto ocurre en los capilares pulmonares, donde la llegada del O_2 favorece la salida de los hidrogeniones desde la Hb, lo que a su vez desplaza la reacción hacia la formación de ácido carbónico, alcalinizando el medio. El ácido carbónico convertido por la AC en CO_2 y H_2O. El CO_2 difunde hacia los alvéolos y la Hb queda con el O_2 listo para ser trasportado (figura 7-12). Un hecho bioquímico interesante de este proceso, es que el bicarbonato formado de la desprotonación del ácido carbónico, sale del eritrocito por transporte reverso con el anión cloruro, para conservar la electroneutralidad eritrocitaria. Esto implica que la sangre venosa posea una mayor concentración extracelular de bicarbonato y una menor de cloruro que la arterial. A pesar de esto, el pH de la sangre venosa es un poco más ácido que el de la arterial, debido a que no todos los hidrogeniones liberados desde el ácido carbónico, se unen a la Hb.

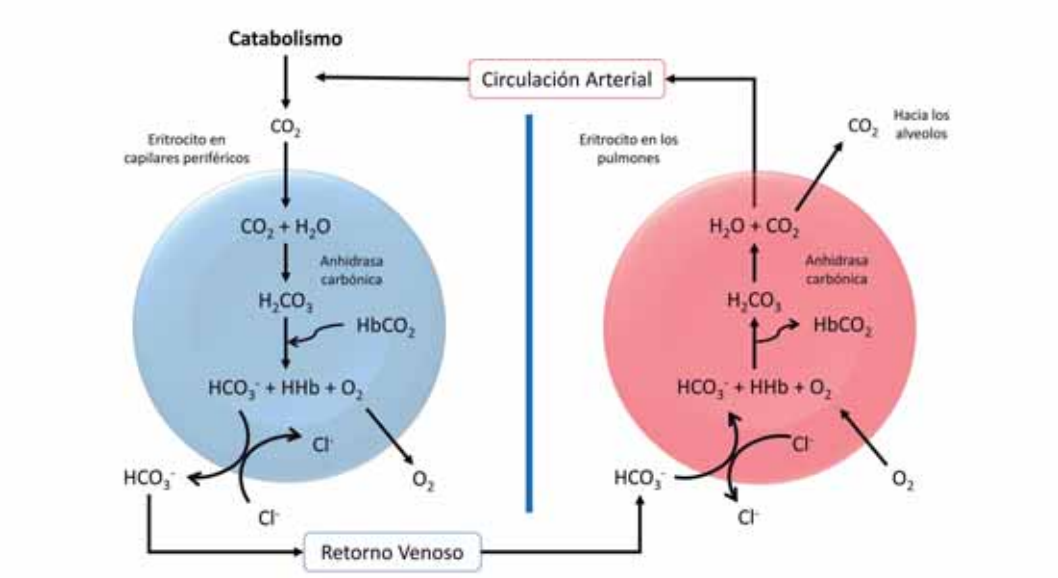


Figura 7-12. Efecto Bohr y su importancia en la captación de O_2 en los pulmones y su entrega en los tejidos periféricos por parte de la hemoglobina. El metabolismo oxidativo genera CO_2 en los tejidos periféricos al pulmón, el cual por acción de la anhidrasa carbónica, es convertido a ácido carbónico, el cual acidifica el pH en el eritrocito, lo que a su vez disminuye la afinidad de la Hb por el O_2, favoreciendo su entrega al tejido. En los pulmones ocurre lo opuesto: las condiciones como la alta concentración de O_2 favorecen la liberación de los hidrogeniones desde la Hb y con ello, induce la formación de ácido carbónico, el que a su vez libera CO_2, el que difunde hacia los alvéolos, favoreciendo la captación del O_2 por la Hb.

Otro hecho importante de mencionar, es que los protones hidrógeno se unen más fácilmente a la estructura desoxi (en estado T) que a la oxi (en estado R) de la Hb. Esto es debido a que hay grupos específicos en la molécula en este estado, que tienen una mayor afinidad por ellas. Se han identificado varios residuos aminoacídicos que están involucrados, siendo especialmente importantes tres lugares que contribuyen al efecto Bohr alcalino: el residuo imidazol de la histidina carboxiterminal ß 146 (HC_3), el grupo amino de la valina N-terminal de la cadena α, y el residuo imidazol de la histidina α 122 (H5). La afinidad de los protones hidrógeno por la hemoglobina se reflejan en su valor de pKa y está influida por la presencia de O_2 y viceversa. Así, la deoxi-Hb tiene un pKa de 7,71, mientras que la oxi-Hb (con sus cuatro O_2) tiene un pKa de 7,16, lo que implica una mayor liberación de H^+. Esta liberación alcanza aproximadamente los 0,7 moles de H^+/mol de Hb.

Con la llegada del O_2, un protón que había sido retenido en un puente salino de la Hb es liberado, lo que también es favorecido o no, en función del pH (pHs altos favorecen la salida de protones). En la cadena ß, el residuo de histidina 146 libera un protón. Otro protón es entonces también liberado desde la valina 1 de una cadena α, la cual previamente en la forma deoxi-Hb se encontraba formando un puente salino con la arginina carboxiterminal de otra cadena α. Entonces,

dado que estos protones proceden de los grupos básicos amino de los radicales imidazol de histidina o del amino-terminal, estos tienden a permanecer protonados frente a bajas de pH. Los puentes salinos se ven por tanto, favorecidos y estabilizan la forma deoxi-Hb y disminuye la afinidad por el O_2. El efecto Bohr es, por lo tanto, una consecuencia de la naturaleza de la estructura cuaternaria de la Hb, ya que cuando las cadenas globinas son disociadas, se pierde este efecto. Además, el efecto Bohr tampoco se observa en la mioglobina que recordemos, es monocatenaria.

c) 2-3 DPG

El 2-3 DPG corresponde al 15% del contenido aniónico del glóbulo rojo y es producido por el catabolismo de la D-glucosa, alcanzando concentraciones intracelulares de 5 mmol/L, acercándose a la equimolaridad de la Hb eritrocitaria. Se forma desde el 1-3 DPG de la glicólisis por la enzima isomerasa BPG mutasa (bifosfoglicerato mutasa). El 2-3 DPG no tiene función metabólica, por lo que para volver a la glicólisis debe ser convertido a 3-fosfoglicerato por la 2-3 BPG fosfatasa (2-3 bifosfoglicerato fosfatasa), como se ve en la figura 7-13. La concentración de 2-3 DPG es proporcional a la concentración de hidrogeniones en el eritrocito, favoreciéndose su síntesis frente a bajas del pH.

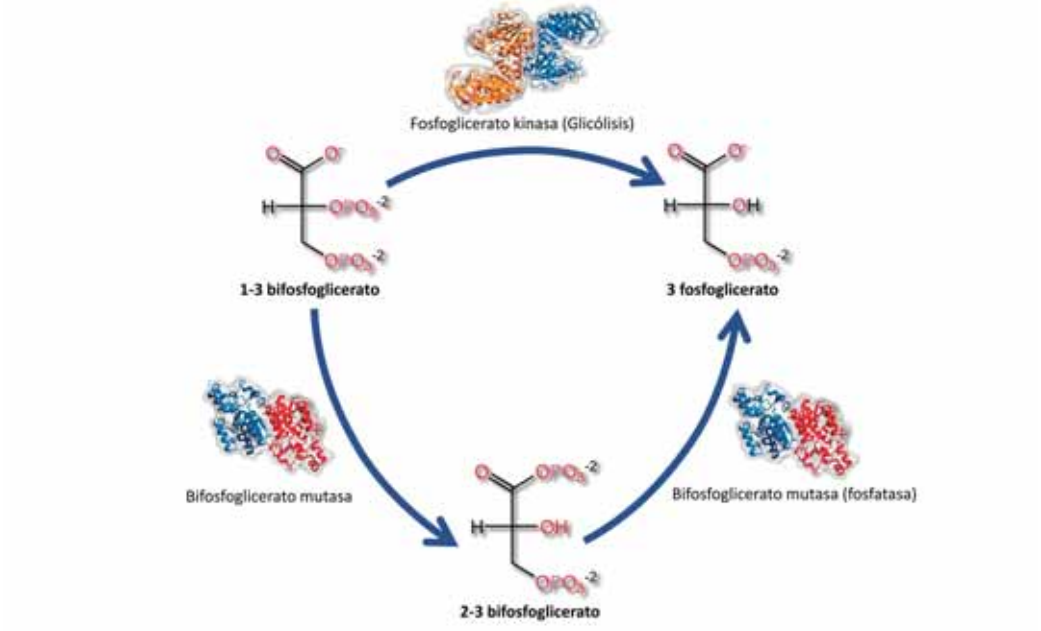


Figura 7-13. Síntesis y degradación del 2-3 bifosfoglicerato.

El glóbulo rojo humano y el de otros mamíferos, tiene concentraciones muy altas de 2-3 DPG. Aunque es el fosfato orgánico más abundante al interior del glóbulo rojo, está presente solo en cantidades trazas en otros tejidos. Su concentración dentro del eritrocito es de 5 mM por litro de eritrocitos concentrados. Todos los otros fosfatos orgánicos se encuentran en concentraciones mucho

menores. En el año 1967, dos grupos de investigadores en forma independiente, demostraron que el 2-3 DPG es un potente modificador de la función de la Hb. Al extraer de la Hb todos los fosfatos orgánicos intraeritrocitarios, esta tiene una afinidad por O_2 inesperadamente alta, aunque la interacción hemo-hemo y el efecto Bohr permanezcan intactos. En sentido inverso, la adición de bajas concentraciones de 2-3 DPG resulta en una disminución progresiva en la afinidad por O_2. Es decir, el 2-3 DPG favorece la liberación de O_2 desde la Hb, lo que ocurre en capilares periféricos, con bajas pO_2 y un ambiente más ácido. Lo opuesto ocurre en capilares alveolares.

El 2-3 DPG se une a la desoxihemoglobina en una relación molar de 1:1, y mucho menos fuertemente, a la oxihemoglobina y otras formas ligadas como la carboxi o cianmetahemoglobina. El ATP se une a la Hb competitivamente con el 2-3 DPG, y al igual que este, es en una relación molar de 1:1. Además de los protones, CO_2 y cloruro, el 2-3 DPG se une a la Hb de una forma recíproca al O_2

$$Hb\text{-}DPG + 4O_2 \leftrightarrow Hb\,(O_2)_4 + DPG$$

Los lugares precisos de la Hb sobre los cuales se une el 2-3 DPG, es esencialmente entre las cadenas ß, involucrando al grupo amino N-terminal de la cadena ß, el imidazol de la histidina ß143 y el grupo amino de la lisina ß 82 (EF6). Esto explica que la Hb A1C (glicada) y la F1, hemoglobinas que tienen bloqueado el N-terminal de la cadena ß, tengan marcadamente disminuida su reactividad con el 2-3 DPG. Además, se ha demostrado que el CO_2 compite con el 2-3 DPG en su unión a la Hb. La alta afinidad de la Hb por el O_2 de la sangre fetal puede explicarse por la elevada reactividad de la Hb F humana con el 2-3 DPG y podría justificarse por las diferencias en la estructura primaria entre las cadenas ß y γ en la posición 143 (H21): histidina (aminoácido básico) en la cadena β y serina (aminoácido no polarizable) en la cadena γ. En resumen, como se ha dicho, el 2-3 DPG se une firmemente a lugares específicos sobre la desoxihemoglobina, sin embargo, los cambios conformacionales inducidos por la oxigenación debilitan esta unión, expulsando de una forma definitiva al 2-3 DPG cuando se alcanza la forma R, al incorporarse el tercer O_2 al tetrámero.

2.2.5. Sistema tampón de la Hb

Dependiente del efecto Bohr, la unión de protones a la Hb representa el sistema tampón más importante para mantener neutro el pH intracelular en el eritrocito. Es decir, la mayor parte del CO_2 producido en los tejidos pasa a los hematíes, donde se hidrata rápidamente gracias a la acción de la anhidrasa carbónica eritrocitaria, se genera H_2CO_3 que se disocia a H^+ y HCO_3^-, siendo la Hb capaz de captar este hidrogenión y equilibrando de este modo, el pH intracelular. Como se mencionó, la Hb es capaz de captar/liberar aproximadamente 0,7 moles de H^+/mol de Hb. Por otro lado, el bicarbonato formado en los eritrocitos pasa a constituir en el plasma, el sistema amortiguador más eficaz de que dispone la sangre y el medio extracelular en general: el tampón bicarbonato a su vez constituye la principal forma de transporte del CO_2 sanguíneo de forma isohídrica, no unido a Hb.

2.2.6. Transporte de CO_2 por la Hb

El CO_2 es transportado de dos maneras: principalmente como ión bicarbonato en el transporte isohídrico del CO_2 y en un 10% como complejo carbamino con la Hb. El CO_2 puede combinarse covalentemente de forma no enzimática con el grupo amino N-terminal de la primera valina de la Hb, formando la carbamino-hemoglobina (carbamino-Hb). Esta reacción es rápida, simple y reversible.

$$Hb\text{-}NH_2 + CO_2 \leftrightarrow Hb\text{-}NH\text{-}COO^- + H^+$$

Lo mismo que con la unión a los protones, la carbamino-Hb tiene, a un pH determinado, una afinidad por el O_2 más baja que lo que tiene la Hb en ausencia de CO_2. Las cadenas α y β difieren en su interacción con el CO_2. En ausencia de fosfatos orgánicos como el 2-3 DPG, la cadena β de la desoxihemoglobina se une al CO_2 con una afinidad aproximadamente tres veces mayor que la cadena α.

2.2.7. Interacción con aniones inorgánicos

La afinidad de la Hb por el O_2 disminuye progresivamente en la presencia de concentraciones ascendentes de fosfato inorgánico o de anión cloruro. Estos aniones inorgánicos se unen más fuertemente a la desoxihemoglobina que a la oxihemoglobina. Los sitios de enlace a la desoxihemoglobina han sido identificados mediante análisis de rayos-X. En ausencia de fosfatos orgánicos, hay dos sitios en la molécula de desoxihemoglobina que tienen una relativamente alta afinidad por el cloruro: los grupos α amino de las cadenas α, y el grupo ε amino del aminoácido lisina 82 de la cadena β (EF6). Ya que este último sitio señalado es un importante lugar de unión del 2-3 DPG, es muy probable que no una cantidades significativas de cloruro en condiciones fisiológicas. En contraste a esto, la interacción del cloruro en la región N-terminal de la cadena α es un importante determinante de la función de la Hb. El enlace del cloruro en este sitio estabiliza la hidrogenación de este grupo amino, elevando su pKa. Después de la oxigenación, tanto el cloruro como el protón son liberados. Así parte de la dependencia del pH por parte del fenómeno de oxigenación (efecto Bohr) está relacionado al enlace del cloruro. De hecho, el efecto Bohr alcalino disminuye a alrededor de la mitad, si la concentración del ión cloruro está reducida desde el nivel fisiológico (0,1 M) hasta cero.

3. CATABOLISMO DE LA Hb

La vida media de los hematíes cuando pasan de la médula ósea al sistema circulatorio, es de aproximadamente 120 días. Una vez que la membrana de los hematíes se hace frágil, la célula puede romperse al pasar a través de algún vaso sanguíneo estrecho de la circulación. Sin embargo, la mayoría de los hematíes se fragmentan en el bazo, donde se estrujan al pasar a través de la pulpa roja y no reciben la cantidad de glucosa adecuada, lo que termina alterando su metabolismo. Los eritrocitos envejecidos por lo regular tienen un aumento en la permeabilidad de cationes y disminuyen rápidamente la concentración de ATP, al intentar mantener un equilibrio osmótico mediante el bombeo de

estos cationes en exceso fuera de la célula, por tanto, el medio esplénico está bien preparado para eliminar estos eritrocitos. Los espacios entre las trabéculas estructurales de la pulpa roja, por los cuales deben pasar la mayor parte de las células, son solo de 2-3 µm de ancho, comparados con los 8 µm de diámetro de los hematíes. Cuando se extirpa el bazo, aumenta considerablemente el número de hematíes anormales y de células envejecidas circulantes.

Normalmente, la destrucción de los glóbulos rojos se lleva a cabo preferentemente en el espacio extravascular (90%). Los macrófagos del recubrimiento interno de los vasos sanguíneos, especialmente del bazo y del hígado, fagocitan (ingieren y destruyen) a los hematíes envejecidos, anormales o fragmentados. La Hb liberada por la destrucción celular es fagocitada y digerida por el sistema fagocítico-mononuclear (SFM), liberando:

a) Hierro. El hierro vuelve a la médula ósea para ser utilizado en la formación de nueva Hb o va al hígado y otros tejidos donde se almacena en forma de ferritina o hemosiderina, pero la mayor parte se une a su proteína de transporte, la transferrina.
b) Aminoácidos: los aminoácidos, liberados de las globinas de la Hb, son utilizados en la síntesis de nuevas proteínas ("pool" de aminoácidos).
c) Bilirrubina: El grupo Hemo se rompe por el puente metileno del anillo de la protoporfirina IX, se libera el hierro, produciéndose un mol de monóxido de carbono (CO) y biliverdina por mol de protoporfirina. A través de varias reacciones sucesivas, la protoporfirina IX se termina transformando en el pigmento bilirrubina.

4. CATABOLISMO DEL GRUPO HEMO

El grupo hemo es abierto cuando aún tiene al hierro en su estructura y está unido a la cadena globina. Lo que ocurre es la oxidación del puente metileno del anillo de protoporfirina IX por parte de la enzima Hemooxigenasa microsomal (figura 7-14). Se piensa que la presencia del hierro en estas etapas, favorece esta oxidación, ya que las oxidaciones de anillos de porfirina solos, son eventos más raros en el metabolismo de los mamíferos. El CO se libera al torrente sanguíneo y se transporta como carboxihemoglobina a los pulmones, y se exhala. El CO se une fuertemente el grupo hemo de la Hb, unas 200 veces más que el O_2, por lo que las concentraciones de CO deben mantenerse muy bajas. Al abrirse el anillo protoporfirínico, se forma la **verdoglobina** y es el pigmento responsable del tono verdoso de los hematomas. La biliverdina resulta al separarse la estructura pirrólica de las cadenas globinas y es rápidamente reducida en su puente central de metileno dentro de la célula fagocítica por la enzima biliverdina reducasa, formándose **bilirrubina.** También se degradan las cadenas globinas y se recuperan el hierro y los aminoácidos. Una vez liberada del macrófago, esta bilirrubina, que posee un color amarillo-anaranjado, se une a la albúmina plasmática, dado que no es hidrosoluble, a pesar de poseer grupos polares.

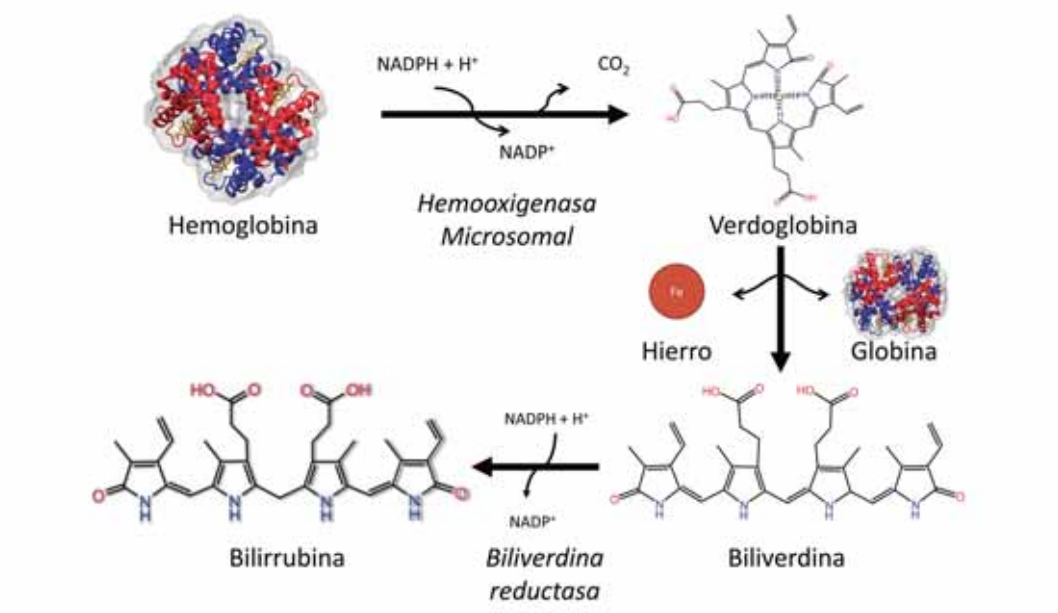


Figura 7-14. Catabolismo del grupo hemo. Dentro de la célula fagocítica, el grupo hemo es oxidado en su puente metileno por acción de la hemooxigenasa microsomal, formándose verdoglobina. El hierro es entonces recuperado en la célula, mientras que la estructura pirrólica (biliverdina) es separada de las cadenas globinas, cuyos aminoácidos también se recuperan. La biliverdina es entonces reducida en su puente meténico central, formando bilirrubina, que es transportada al hígado por la albúmina.

El hecho de que la bilirrubina, teniendo grupos aniónicos polares (los grupos propiónicos), sea insoluble en agua, se debe a que esta molécula establece puentes de hidrógeno intramoleculares (configuración ZZ), que la deja incapaz de establecer interacciones con las moléculas de agua del plasma (figura 7-15). Lo mismo ocurre con la biliverdina. Por ello, la bilirrubina es transportada en sectores hidrofóbicos de la albúmina plasmática. Esto es lo que se conoce como **bilirrubina no conjugada** y es llevada al hígado. Estos puentes de hidrógeno intramoleculares pueden ser rotos por la luz u.v. (configuración EE) y esto es el principio de la fototerapia aplicada a los recién nacidos con anemia hemolítica. La fototerapia entonces, solubiliza a la bilirrubina y permite su eliminación por la orina, desde el plasma. Otra forma de romper las uniones débiles intermoleculares de la bilirrubina es con solventes "aceleradores" que rompen estas uniones, como el metanol y el benzoato y cafeína. En el laboratorio, a la bilirrubina que no requiere de ningún solvente particular o "acelerador" para ser determinada, se le denomina **bilirrubina directa**, mientras que aquella que es insoluble, y por lo tanto requiere de aceleradores para ser medida, se le denomina bilirrubina indirecta. La bilirrubina no conjugada corresponde a la fracción indirecta. El aumento de los niveles de **bilirrubina indirecta** en sangre, se da en cuadros donde se produce anemia hemolítica dando lugar a la ictericia de origen pre-hepático. Alternativamente, ictericias por bilirrubina indirecta se pueden dar por un daño o defecto hepático que impida su conjugación (Síndrome de Gilbert, Crigler-Najjar).

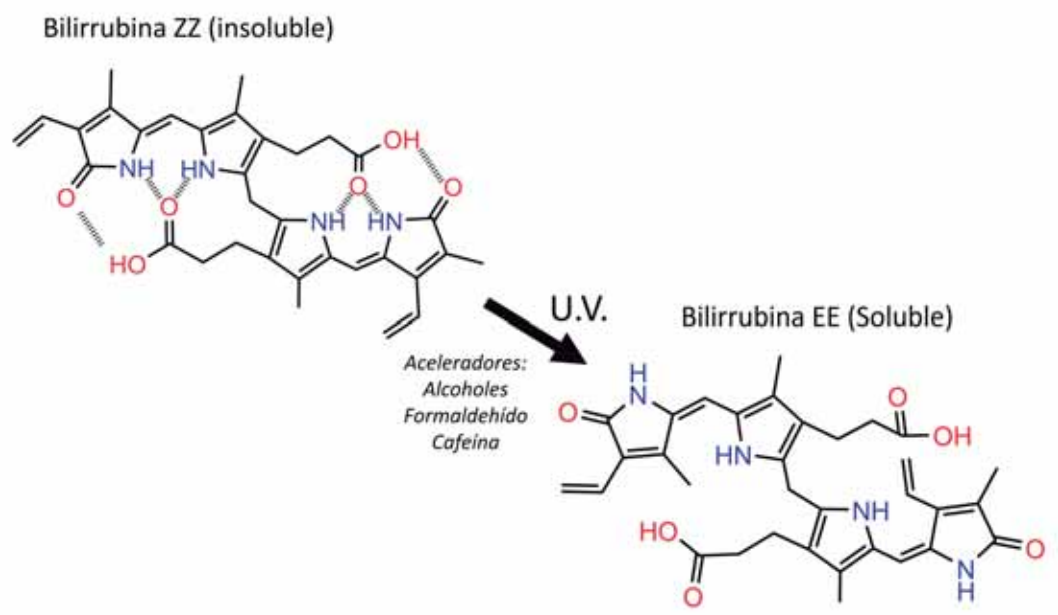


Figura 7-15. Estructura de la bilirrubina no conjugada. La bilirrubina no conjugada establece puentes de hidrógeno entre sus grupos químicos, dejando a los grupos propiónicos polares, incapacitados para establecer interacción con las moléculas de agua, volviéndola insoluble (configuración). La luz UV y solventes como el metanol, rompen estos puentes y la solubilizan. Este es el principio para la fototerapia en recién nacidos con anemia hemolítica (luz UV) y el del uso de solventes aceleradores para determinar a la bilirrubina indirecta en el laboratorio.

En el hígado, la bilirrubina es conjugada, proceso en el que se le unen azúcares ácidos (glucoronatos) unidos a un UDP (UDP-glucoronato) a uno (monoglucoronato de bilirrubina) o más frecuentemente a dos (diglucoronato de bilirrubina) de los grupos propiónicos de la bilirrubina, catalizado por la enzima **2-UDP-glucoronil tranferasa**. Estos glucoronatos solubilizan a la bilirrubina, abriendo la estructura (figura 7-16). Esto es lo que se le conoce como bilirrubina conjugada y corresponde a prácticamente toda la bilirrubina directa. Solo una pequeña fracción de la directa corresponde a la **bilirrubina delta**, la cual se produce por la unión covalente espontánea a albúmina de la bilirrubina no conjugada, lo cual la abre y "solubiliza". Esta bilirrubina puede aumentar en estados colestásicos prolongados. Rutinariamente, en el laboratorio no se determina la fracción delta, por lo que solo se suele informar como bilirrubina directa, entendiendo que casi toda responde a la presencia de bilirrubina conjugada. El aumento en los niveles de la bilirrubina conjugada, ocurren en enfermedades inflamatorias (hepatitis, colangitis) y obstructivas hepáticas (colestasis por cálculos o tumores).

Desde el hígado, la bilirrubina conjugada se excreta a la bilis para ser convertida a urobilinógeno en el tracto intestinal por la microbiota y una parte de este es reabsorbido por el intestino (el resto se excreta) y pasa a la sangre desde el sistema Porta-hepático. Este urobilinógeno es soluble y filtra en el glomérulo, por lo que se excreta por la orina. El urobilinógeno es incoloro, pero al ser expuesto

al oxígeno y luz, es oxidado a urobilina, que le da a la orina su característico color ámbar. La mayor parte del urobilinógeno que no se excreta, es reducido en el intestino por la microbiota, dando lugar al estercobilinógeno, que finalmente se oxida y genera estercobilina, el pigmento que le da el color a las heces.

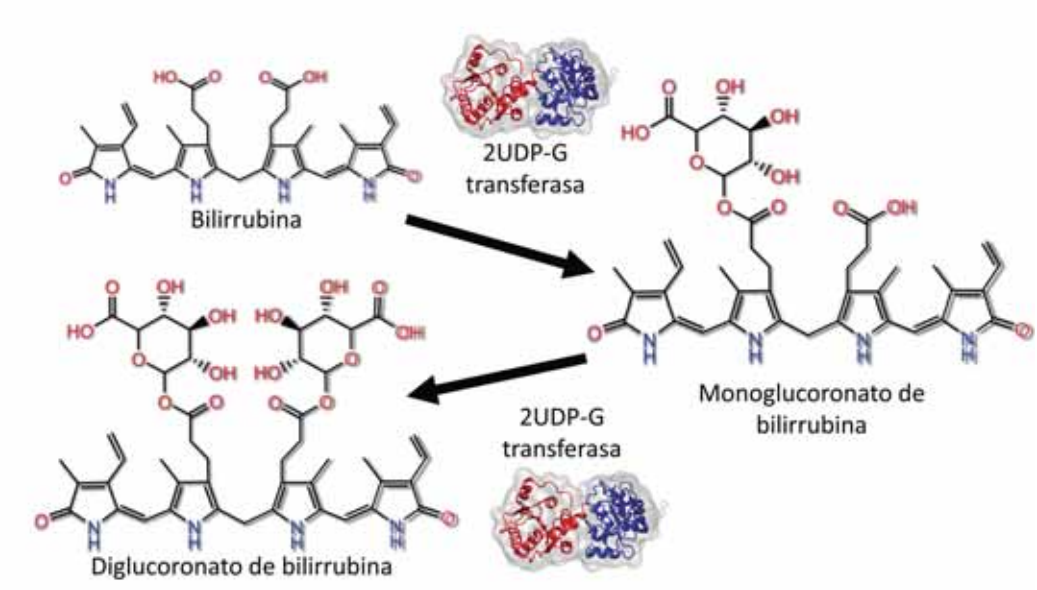


Figura 7-16. Conjugación hepática de la bilirrubina. En este proceso, la bilirrubina es conjugada con uno o dos azúcares ácidos glucorónicos en sus grupos propionato, lo que le permite permanecer abierta y soluble. Esto es catalizado por la enzima 2UDP-glucoronil transferasa en el hígado, dejando a la bilirrubina lista para ser excretada en la bilis.

5. LECTURAS SUGERIDAS

Ahmed M.H., Ghatge M.S., Safo M.K. "**Hemoglobin: Structure, Function and Allostery**. In: Hoeger U., Harris J. (eds) Vertebrate and Invertebrate Respiratory Proteins, Lipoproteins and other Body Fluid Proteins. Subcellular Biochemistry, vol 94. Springer, Cham. (2020) https://doi.org/10.1007/978-3-030-41769-7_14

Schechter, Alan N. "**Hemoglobin research and the origins of molecular medicine**." Blood vol. 112,10 (2008): 3927-38. doi:10.1182/blood-2008-04-078188

Franco Vera L. **"LA HEMOGLOBINA: UNA MOLÉCULA PRODIGIOSA."** Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fís. Nat. (Esp) Vol. 104, N°. 1, pp 213-232, 2010

Medina E., Carbajal B., Ponce C., Sandoval N. y Valladares E. **"Las Porfirias".** Rev Med Hond, 68:16-24, 2000.

Daniel A. Jaramillo-Calle. **"El grupo hemo y la ácido aminolevulínico sintasa 1 en la fisiopatología de los ataques agudos de porfiria."** Revista de Laboratorio Clínico. Vol. 10. Núm. 3. páginas 162-170 (Julio - Septiembre 2017)

Kaufman DP, Khattar J, Lappin SL. Physiology, **Fetal Hemoglobin**. [Updated 2021 Mar 29]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500011/

James M. Manning, Anthony M. Popowicz, Julio C. Padovan, Brian T. Chait, Lois R. Manning. **"Intrinsic regulation of hemoglobin expression by variable subunit interface strengths".** The FEBS Journal. Volume279, Issue3, Pages 361-36, 2012

Villavicencio-Queijeiro Alexa. **La mitocondria como fábrica de cofactores: biosíntesis de grupo hemo, centros Fe-S y nucleótidos de flavina (FMN/FAD)**. TIP. 2012 Dic: 116-132. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-888X2012000200005&lng=es.

Foradori, A. "Hemoglobina Metabolismo y Función" en **Fisiología de la sangre,** Mezzano D., Pereira J. Eds. Editorial P. Universidad Católica de Chile, 1993.

Garraty, G., Telen, M.J., Petz, L.D. "Red Cell Antigens as Functional Molecules and Obstacles to Transfusion". *Hematology*, 445-462, 2002.

Huisman T.H.J. "The structure and function of normal and abnormal haemoglobins" In **The Haemoglobinopathies**, Higgs, D.R., Weatherall, D.J., Baillère Clin Haematology, W. B. Saunders, London 1993; 6:1.

Kutlar F., Kutlar A., Gu Y. C., et al. "Adult hemoglobin levels in newborn babies from different countries and in babies with some significant hemoglobinopathies".

Perrella, M., Bresciani, D., and Rossi-Bernardi, L. "The binding of CO2 to human hemoglobins". *J. Biol. Chem* 1975; 250: 5413.

Perutz, M.F., Kilmartin, J.B., Nishikura, K., et al. "Identification of residues contributing to the Bohr effect of human hemoglobin". *J. Mol. Biol* 1980; 138:649.

Rodak, Bernadette, **Diagnostic Hematology,** Ed. W.B. Saunders, 1995.

Tuchinda, S., Nagai, K., and Lehmann, H. "Oxygen dissociation curve of haemoglobin Portland". FEBS 1975; Lett. 49: 390.

Capítulo

8

METABOLISMO DEL HIERRO

Miguel Arredondo O., Matías Rivera B., Iván Palomo G.

Resumen

1. Introducción

2. Metabolismo del hierro
- 2.1. Homeostasis del hierro
- 2.2. Absorción intestinal de hierro
- 2.3. Regulación intracelular de los niveles de hierro
  - 2.3.1. Transportador de metales divalentes 1 (DMT1)
  - 2.3.2 Receptor para transferrina
  - 2.3.3. Proteína HFE
  - 2.3.4. Transportador Ferroportina 1 (FPN1)
  - 2.3.5. Hefestina
  - 2.3.6. Hepcidina
  - 2.3.7. Transportador de hierro hemínico: HCP1
- 2.4. Modelo de homeostasis del hierro
- 2.5. Biosíntesis del Hem

3. Lecturas sugeridas

RESUMEN

El hierro (Fe) es un metal esencial para el ser humano, sin embargo, existe la paradoja que un exceso del metal puede ser tóxico y desencadenar procesos de muerte celular. La homeostasis de Fe es un proceso regulado por su absorción a través del enterocito, tanto por la expresión de los transportadores de entrada y/o salida como por la presencia de factores reguladores tal como la hormona Hepcidina. La absorción del Fe, ya sea en su forma hemínica (Fe-hem) y no-hemínica (Fe no-hem), se realiza por sus transportadores específicos para cada una de sus formas. La absorción del Fe-hem parece ser afectada solamente por la presencia de proteínas animales que facilitan su absorción y por calcio que pueden inhibir su absorción. En cambio, la absorción del Fe no-hem es influenciado por una gran cantidad de factores, que disminuyen su absorción tales como calcio, fosfato, caseína, polifenoles, fitatos; o aquellas que la favorecen como el ácido ascórbico y péptidos derivados de la digestión de las carnes.

1. INTRODUCCIÓN

El hierro es el tercer metal más abundante en la corteza terrestre y se encuentra en 2 estados redox: ferroso (Fe^{2+}) y férrico (Fe^{3+}). Este mineral es indispensable para la vida, sirve como cofactor de muchas enzimas, hemoproteínas y proteínas no hem que cumplen funciones biológicas cruciales como síntesis de DNA, síntesis de ARN, transporte de oxígeno (hemoglobina), metabolismo del oxígeno (oxidasas, peroxidasas, catalasas e hidroxilasas), transporte de electrones (citocromos) y en el ciclo de Krebs. Sin embargo, las mismas propiedades que lo hacen útil y esencial le proporcionan características tóxicas cuando se encuentra en exceso. El hierro libre puede generar radicales libres que dañan componentes biológicos esenciales (lípidos, proteínas y DNA), a través del proceso denominado Ferroptosis, que corresponde a una muerte celular, no apoptótica mediada por hierro. Para regular una posible alteración en los niveles de hierro, el organismo debe ser capaz de detectar y estimar cuándo existe un déficit o un aumento de hierro, el cual debe ser controlado principalmente a través de la absorción de hierro, más que a través de su excreción. Una respuesta inapropiada (desregulación) o una carencia de respuesta frente al estímulo conducirían por un lado a una deficiencia de hierro, eritropoyesis ineficiente y posteriormente a una anemia por deficiencia de hierro o por otro, a una sobrecarga de hierro.

En medios biológicos, el Fe se distribuye principalmente asociado a proteínas (60-70% en hemoglobina, 10% en mioglobina, citocromos y otras enzimas que contienen Fe y 20-30% en proteínas de almacenamiento como Ferritina (Fn: proteína esférica hetero-polimérica compuesta de 24 subunidades que permite la unión y almacenaje de hasta 4.500 átomos de hierro), y la Hemosiderina (que corresponde a un conjunto de péptidos y hierro producto de la degradación

parcial de la Ferritina en los lisosomas, en el sistema reticuloendotelial y células parenquimatosas hepáticas). Los requerimientos de hierro en el ser humano son a nivel de elemento traza. Diariamente se deben absorber desde la dieta 1-2 mg para cumplir con los requerimientos y se excreta principalmente a través de las deposiciones (orina, sudor y fanéreos en menor grado), la misma cantidad de este ion. Así en el hombre y en la mujer adultos el contenido de Fe es aproximadamente 55 y 45 mg de Fe por kg de peso, respectivamente.

2. METABOLISMO DEL HIERRO

2.1. Homeostasis del hierro

La mayor parte de las necesidades de hierro del organismo son suplidas por: (1) la absorción intestinal (ver más adelante) o (2) la reutilización del hierro proveniente de la destrucción de los glóbulos rojos senescentes. El hierro producto del catabolismo de la hemoglobina, en el sistema reticuloendotelial, se une en el plasma a la proteína transportadora Transferrina (Tf). La Tf sérica es una glicoproteína proteína plasmática, de aproximadamente 80 kDa, de cadena polipeptídica única, a la que se unen hidratos de carbono. Se puede encontrar también en el líquido cefalorraquídeo, leche y semen. Su ligando natural es el Fe^{3+} al que une con alta afinidad, sin embargo, puede unir una variedad de iones multivalentes. En condiciones fisiológicas, la constante de estabilidad efectiva es del orden de 10^{20} M^{-1}. La Tf es capaz de unir un ion férrico a cada uno de sus dos sitios, los cuales poseen 40% de homología, difiriendo en sus propiedades químicas, cinéticas, espectroscópicas y termodinámicas. El dominio de mayor afinidad para el hierro, es el ubicado en la región C-terminal. En un pH fisiológico y en presencia de ion bicarbonato, el hierro se une a cualquiera de los dos sitios de la Tf humana. En condiciones normales, la Tf se encuentra saturada con hierro, en aproximadamente un 30%, por lo que existe una reserva latente de unión al metal en casos de absorción o liberación de grandes cantidades de hierro.

La Tf es unida por el Receptor para Transferrina (RTf; ver más abajo) y así es entregado a la célula cuando el complejo RTf-Tf es internalizado a través de un proceso de endocitosis, que no solo ocurre en los precursores eritroides de la médula ósea (para ser reutilizado en la producción de hemoglobina) sino que también en todas las células del organismo. En el adulto, el 95% del hierro empleado en la síntesis de hemoglobina proviene de este reciclaje, mientras que en un lactante de 1 año este valor es de solo un 70%, por lo tanto, este último es más dependiente del aporte externo de este mineral.

Las pérdidas de hierro son bastante restringidas y fijas. Estas ocurren principalmente a nivel del intestino a través de las deposiciones, por sangramiento fisiológico y descamación celular. Menos importantes son las debidas a la descamación de piel y fanéreos, sudoración o eliminación urinaria. En los niños de 0 a 2 años, las pérdidas se han estimado en 0,04 mg/Kg y de 0,03 mg/Kg en niños de 2 a 8 años de edad. Las pérdidas en el adulto son de alrededor de 0,9 mg

diarios (0,5 mg/m^2). En la mujer en edad fértil, la menstruación eleva las pérdidas totales a ~1,5 mg diarios. Existen importantes variaciones individuales en la pérdida de hierro por la menstruación, sin embargo, en una misma mujer esta variación entre diferentes períodos es pequeña. Por otra parte, los métodos anticonceptivos pueden alterar significativamente la pérdida menstrual. La pérdida de hierro es menor a lo normal en mujeres que utilizan tabletas anticonceptivas y mayor que lo normal cuando utilizan dispositivos intrauterinos.

2.2. Absorción intestinal de Fe

El hombre es capaz de reutilizar el hierro proveniente de la destrucción de los eritrocitos senescentes debido a la acción de los macrófagos del sistema retículo endotelial. Además, del total de hierro que se moviliza diariamente, solo se pierde una pequeña proporción a través de las heces, orina, sudor y la descamación celular. Por lo que, se requiere un pequeño aporte diario a través de la ingesta para reponer las pérdidas. La dieta normal contiene aproximadamente 10-20 mg de hierro, de lo cual, solo se absorben entre 1-2 mg al día, que puede variar en función de las necesidades tales como: la actividad de la médula ósea, el nivel de sus reservas, la concentración de hemoglobina, la concentración de oxígeno en sangre y las situaciones de inflamación a nivel sistémico.

El metabolismo del hierro está regulado fundamentalmente por su absorción, proceso que ocurre preferentemente en las primeras porciones del intestino delgado. Los estudios radio isotópicos de absorción del metal han mostrado que el hierro de los alimentos vegetales es pobremente absorbido, no ocurriendo así con los alimentos de origen animal. Esto se debe a que en la dieta existen dos formas de hierro, que tienen un comportamiento diferente: (a) hierro inorgánico o no-hem, que es el presente en las sales de hierro y en los alimentos vegetales, y (b) hierro hem proveniente de las carnes rojas principalmente (mioglobina) y de la sangre (hemoglobina).

El hierro no hemínico se encuentra en los alimentos en forma de complejos férricos. Estos complejos se degradan durante la digestión, integrándose el hierro liberado a un "pool" común de hierro ionizado, quedando por tanto sometido a la interacción con factores intraluminales, provenientes de la dieta o propios del intestino, que van a inhibir o facilitar su absorción. Las principales fuentes de hierro no hemínico son de origen vegetal y en algunos alimentos de origen animal tales como la leche y el huevo, y se encuentra mayormente en su forma oxidada (Fe^{3+}) y unido a diversas macromoléculas. En la dieta habitual hay un predominio de los ligandos inhibidores, los que actúan formando complejos de hierro insolubles. Entre los inhibidores, provenientes de la dieta, uno de los más potentes son los polifenoles especialmente los taninos, los que están presentes en el té, café y otras infusiones y en algunos alimentos vegetales (legumbres, espinacas, cereales, etc.). La ingestión de té es capaz de reducir marcadamente la absorción del hierro de la dieta, el café presenta un efecto similar pero menos pronunciado. Tienen también un efecto depresor de la absorción los fitatos, calcio, carbonatos, oxalatos, fosfatos, el salvado y la yema de huevo. De los fa-

cilitadores de la absorción de hierro, el ácido ascórbico es el que tiene el efecto más notable. Su acción pareciera deberse a que forma complejos solubles con el hierro y a que es capaz de reducir el hierro férrico a ferroso, forma que es más absorbible. Esta vitamina en relaciones molares con hierro superiores a 1:1 es capaz de duplicar la absorción del hierro inorgánico de la dieta. Presentan también un efecto favorecedor de la absorción de hierro, la carne de vacuno, el pescado, algunos aminoácidos como la cisteína, algunos ácidos orgánicos (láctico, cítrico, málico, tartárico) y azúcares. Por otro lado, la secreción ácida gástrica tiene un efecto beneficioso al mantener el hierro en su forma reducida (ferrosa). Por el contrario, un aumento del pH intestinal, como sucede por la acción del bicarbonato presente en la secreción pancreática, inhibe la absorción del hierro al favorecer la formación de quelatos insolubles.

La absorción de hierro está marcadamente influenciada por factores extraluminales, como son el estado de los depósitos de hierro, la velocidad de la eritropoyesis y la hipoxia. A menores depósitos corporales de hierro o mayor velocidad de eritropoyesis existe un aumento de la absorción en el intestino. Además, existe una relación inversa entre la cantidad de hierro ingerida y el porcentaje absorbido.

El hierro hemínico solo representa el 10-20% del hierro presente en la dieta, pero su absorción es más eficiente El hierro hemínico proveniente principalmente de las carnes rojas es captado en parte por un proceso de transporte activo a través del transportador HCP1 (Hem Carrier Protein 1; ver más abajo) presente en la membrana apical del enterocito. El hierro liberado (indistinguible del Fe inorgánico) queda disponible, dependiendo de las necesidades, para ser utilizado en el citoplasma o entregado a la circulación, donde es transportado unido a la transferrina, acoplándose de este modo al circuito interno del hierro. Por esta característica de absorción, el Fe hemínico no es influenciado por las sustancias favorecedoras o inhibitorias de la absorción del hierro, excepto por la presencia de calcio. La absorción del hierro hemínico es de aproximadamente un 20 a 25%. Otra peculiaridad del hierro hemínico, es que su absorción es menos influenciada por el estado de los depósitos de hierro.

En los organismos superiores la homeostasis del hierro está centrada a nivel de las células epiteliales del duodeno, las cuales son responsables de los cambios sensibles de la demanda de hierro corporal. En las criptas duodenales existen células precursoras pluripotentes, algunas de las cuales migran hacia las vellosidades y se diferencian en enterocitos, células epiteliales altamente polarizadas. Estas células están especializadas en la absorción y transporte de nutrientes, entre ellos el hierro, mientras que las células precursoras solo tienen una función de sensor de las necesidades de hierro del organismo.

El flujo transepitelial del Fe se divide en 3 fases principales: (a) incorporación del Fe desde el lumen del intestino al interior de la célula; (b) tránsito intracelular y (c) fase de transferencia al plasma. A nivel intracelular, el Fe se encontraría unido principalmente a tres proteínas: mobilferrina, Ferritina, y transferrina plasmática

incorporada desde el plasma vía receptores para transferrina. La etapa de transferencia de Fe desde la célula al medio basal es la menos caracterizada.

Los enterocitos responden a una baja en los depósitos corporales de Fe incrementando su absorción desde la dieta. Estas células regulan el balance de Fe de manera tal que altos niveles corporales bloquean y bajos niveles incrementan la absorción intestinal de este ion. Por lo tanto, se considera a la absorción intestinal como el paso clave en la regulación de estos niveles. Los enterocitos representan un primer sistema de regulación del contenido de Fe relacionado a la edad de la célula. En la cripta intestinal, las células más jóvenes se ubican en el fondo de la cripta y presentan menor contenido de Fe y Ferritina. Las células más envejecidas se localizan hacia la punta de la cripta desde donde se descaman. De esta forma, al perder las células con mayor contenido de Fe, los enterocitos regulan el contenido de Fe almacenado en el epitelio intestinal (Figura 8.1).

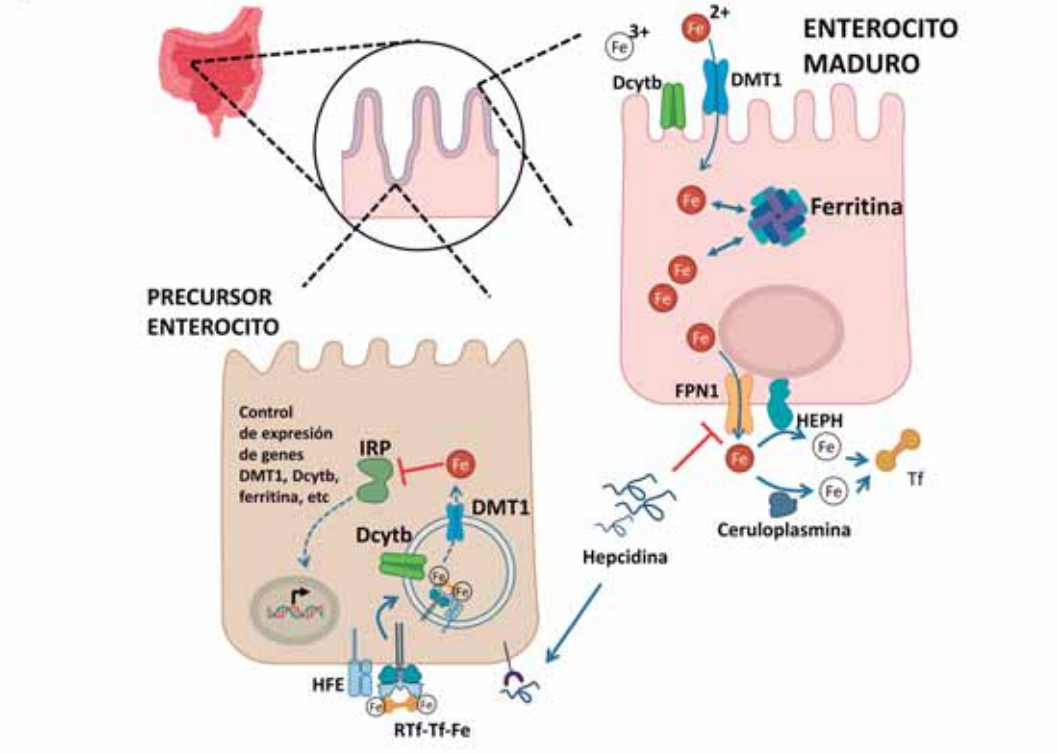


Figura 8.1: Modelo diferencial entre una célula precursora y enterocito maduro. Las células precursoras y los enterocitos maduros se ubican en el fondo y punta de la cripta intestinal, respectivamente. De esta forma, estas células detectan concentraciones diferentes de Fe y por lo tanto la expresión de las proteínas involucradas en el metabolismo intracelular de Fe son distintas.
IRP: Proteína regulatoria de hierro; DCyTb: Citocromo reductasa B duodenal; DMT1: Transportador de metales divalentes 1; HFE: Proteína de la Hemocromatosis hereditaria; RTF-Tf-Fe: Complejo ternario Receptor para transferrina, Transferrina y hierro; FPN1: Transportador Ferroportina 1; HEPH: Hefestina.

Para la mayoría de las células humanas, se ha descrito que el mecanismo de incorporación de Fe, es realizado a través de un proceso de endocitosis de transferrina vía receptores para transferrina (RTf). Este receptor une a la transferrina, la cual puede tener unida una o dos moléculas de hierro (Tf-Fe), formándose el complejo RTf-Tf-Fe. El RTf presenta en su estructura aminoacídica, una señal de internalización, por lo cual a través de un proceso endocítico, se internaliza el complejo RTf-Tf-Fe (Figura 8.2). Una vez en la vesícula endocítica y por el efecto de la acidificación de la vesícula, el Fe es liberado desde la Tf. El complejo RTf-Tf es reciclado a la membrana celular, quedando disponible para un nuevo ciclo y el Fe en el estado ferroso, puede salir de la vesícula endocítica a través de una de las isoformas del transportador de metales divalentes (DMT1, Divalent Metal Transporter 1, ver abajo). El RTf se expresa en todas las células del organismo, incluido las neuronas. La captación de hierro por el enterocito es realizada principalmente por el transportador DMT1, que se expresa en la membrana apical de las células del epitelio intestinal y el contenido de hierro de estas células es complementado por la internalización del complejo RTf-Tf-Fe por la membrana basal del enterocito.

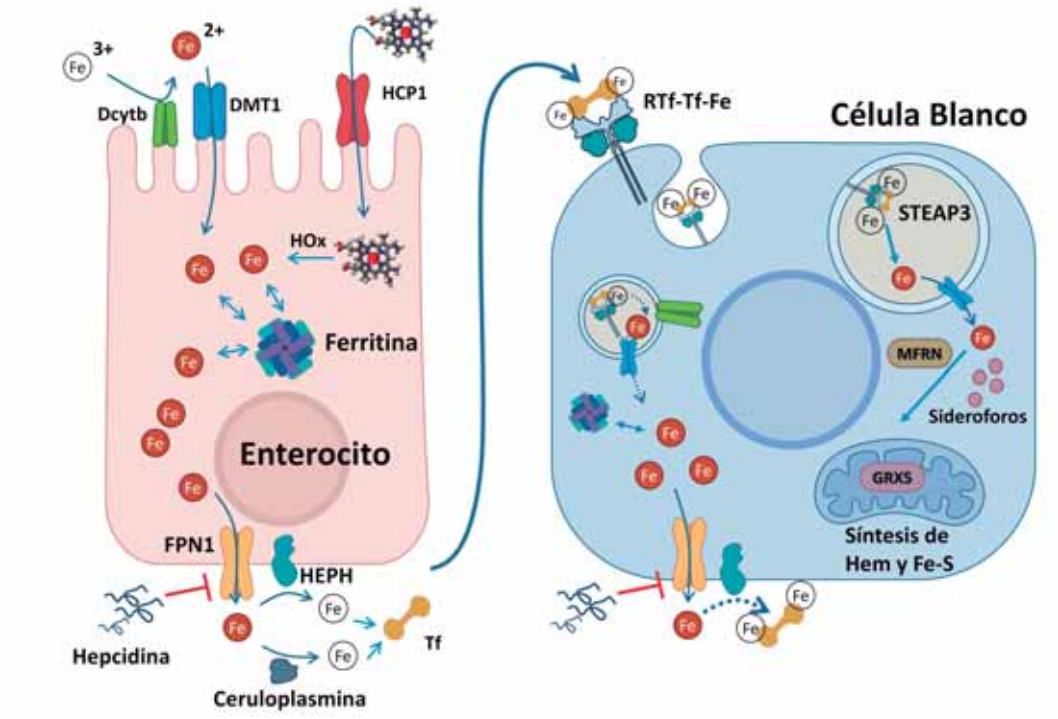


Figura 8.2: Modelo de las proteínas involucradas en la captación, transporte y almacenaje de hierro en el enterocito y células blanco. El hierro dietario es captado por el transportador DMT1. Una vez en el interior puede ser almacenado en ferritina o transportado a la circulación por el transportador Ferroportina 1. En la circulación el hierro es transportado unido a transferrina. Esta es unida por el Receptor para transferrina y de esta forma es internalizado en las células blancos. DCyTb: Citocromo reductasa B duodenal; DMT1: Transportador de metales divalentes 1; HFE: Proteína de la Hemocromatosis hereditaria; RTF-Tf-Fe: Complejo ternario Receptor para Transferrina, Transferrina y hierro; FPN1: Transportador Ferroportina 1; HEPH: Hefestina; HOx: Enzima heme oxigenasa; HCP1: Transportador de hem (Heme Carrier Protein 1); MFRN: Mitoferrina; GRX5: Glutaredoxina 5.

2.3. Regulación intracelular de los niveles de Fe

La expresión de las proteínas que participan en el metabolismo de Fe es regulada traduccionalmente por el sistema regulador de hierro IRP (Iron Regulatory Protein)/IRE (Iron Responsive Element). Las estructuras IREs, corresponden a secuencias de nucleótidos conservadas y están constituidas por 28 bases, con una estructura secundaria en forma de horquilla o pinche, la que le permite interactuar con las proteínas IRP.

Este sistema de regulación está conformado por: (a) los elementos reguladores de hierro: IRE que se encuentran en los extremos 5´ ó 3´ no codificantes de los ARNm que traducen las proteínas involucradas en el metabolismo de Fe, tales como Ferritina, DMT1, RTf y Ferroportina 1 (transportador de salida de Fe en las células de epitelio intestinal). Así, elementos IRE se encuentran en el extremo 5´ de los ARNm de la Ferritina y de Ferroportina 1 y en el extremo 3´ de los ARNm del RTf (5 secuencias IRE) y del transportador DMT1; y (b) las proteínas reguladas por hierro: IRP 1 e IRP 2. La proteína IRP1 es una proteína de 98 kDa, cuya actividad de unión a los elementos IREs es regulada inversamente por la concentración intracelular de Fe, es decir, a menor concentración intracelular de Fe, mayor actividad de unión a IREs. Las proteínas IRP, poseen un núcleo [4Fe-4S] en su sitio activo y puede convertirse reversiblemente en su forma activa [4Fe-4S] o inactiva [3Fe-4S] frente a los cambios en la disponibilidad de hierro. Bajo condiciones de depleción del metal, la apoIRP1 puede unirse con alta afinidad a las secuencias IRE. Contrariamente, cuando el aporte de hierro aumenta, la IRP1 incorpora un átomo del metal al núcleo [4Fe-4S], adoptando una conformación en la cual es incapaz de interactuar con el ARN, pero posee actividad aconitasa. La proteína IRP2 (105 kDa), presenta un 62% de homología con la IRP1, no presenta actividad aconitasa, presenta una actividad de unión constitutiva, es decir, siempre está presente y no depende de la concentración intracelular de Fe. Sin embargo, en su extremo N-terminal contiene una secuencia rica en cisteínas que la hace susceptible de degradación por ubiquitinación vía proteosoma, cuando la concentración de Fe aumenta (Figura 8.3).

Los elementos IRE y las proteínas IRP actúan en conjunto para detectar y responder a los cambios en el pool de hierro en el medio intracelular. Este compartimento se ha denominado pool de hierro reactivo y representaría aproximadamente al 5% del hierro intracelular, y que se encuentra unido a péptidos de bajo peso molecular. Cambios en la concentración de este compartimento es detectado por el complejo IRE/IRP. Las proteínas IRP contienen un núcleo en forma de cubo, que les permite detectar el contenido intracelular de Fe. Cuando el contenido del compartimento de Fe reactivo es bajo, el núcleo se encuentra en un estado conformacional 3Fe-4S, es decir abierto. En estas condiciones, se puede unir a los elementos IRE de los ARNm y así regular su expresión. Cuando la proteína IRP se une al extremo 5´ no codificante del ARNm, se inhibe la traducción pues bloquea la entrada de la subunidad mayor del complejo traduccional. Por otro lado, cuando se une al extremo 3´no codificante, se estabiliza al ARNm ya que impide la acción de las ARNasas. Por lo tanto, cuando el conte-

nido de Fe en el compartimento de Fe reactivo es bajo, las IRPs se unen a los elementos IREs, e impiden la traducción de la Ferritina y ferroportina 1, esto se traduce, por un lado, en una disminución del almacenamiento y, por otro lado, se produce la estabilización de los mensajeros del receptor de transferrina y del transportador DMT1, lo que aumenta la captación de Fe. Cuando el Fe intracelular aumenta, el núcleo de las proteínas IRPs cambia de estado conformacional a 4Fe-4S (estado cerrado) perdiendo su capacidad de unirse a los ARNm y se convierte en la enzima aconitasa citosólica. En esta condición, se produce la traducción de los ARN mensajeros del transportador Fn y la desestabilización de los ARN mensajeros del RTf y DMT1. El resultado final, es un aumento del almacenamiento de hierro y una disminución de la captación del metal por parte de la célula (Figura 8.3).

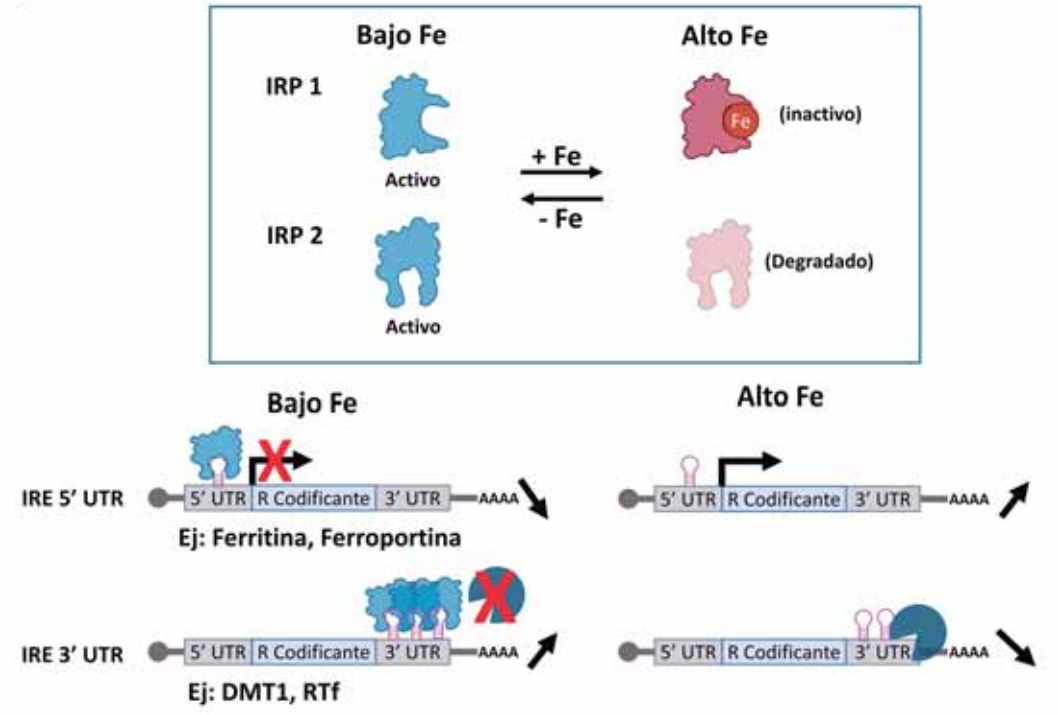


Figura 8.3: Regulación del metabolismo intracelular de Fe: Sistema IRP/IRE. Las proteínas IRP (Proteínas regulatorias de hierro) se unen a los elementos IRE (Elementos que responden a hierro), localizados en los extremos 5` o 3` no traducidos de los RNAm que codifican para proteínas involucradas en el metabolismo de Fe y de esta forma regulan su expresión, ya sea inhibiendo la traducción o estabilizando al RNAm.

2.3.1. Transportador de metales divalentes 1

El transportador DMT1, tal como su nombre lo indica, transporta un amplio rango de sustratos en valencia 2+, entre los que se encuentran Fe^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+}, Cd^{2+}, Ni^{2+}, y Pb^{2+}. Este transportador tiene 4 isoformas, que se producen,

por empalme alternativo y/o presencia de elemento IRE en la región 3´ no traducida. Dos isoformas presentan un motivo IRE, es decir, es susceptible de ser regulada su actividad por el complejo IRE/IRP. Esta isoforma es predominantemente expresada en la membrana apical de las células epiteliales del intestino. Las otras dos isoformas de DMT1, no presentan motivo IRE. Esta isoforma se encuentra presente principalmente en vesículas endocíticas tardías y lisosomas, colaborando al transporte de Fe desde la vesícula hacia el citoplasma, del hierro proveniente del ciclo del RTf-Tf-Fe.

La secuencia del gen DMT1 predice una proteína con doce segmentos de transmembrana, de 561 aminoácidos con sus extremos amino y carboxilo terminal ubicados hacia el citoplasma y es expresado ubicuamente. La expresión de DMT1 es estimulada por una dieta deficiente en hierro y representaría un mediador clave de la absorción de hierro intestinal. En el ambiente intestinal fisiológicamente hipóxico, IRP controla la transcripción del factor inducido por hipoxia 2α (HIF2α, Hypoxia-Inducible Factor 2α) el cual a su vez estimula la síntesis de DMT1.

Cuando existen bajos niveles de hierro, se produce la síntesis y presencia del DMT1-IRE en la membrana apical del enterocito, resultando en la activación de la incorporación de hierro y en una actividad basal de transporte independiente de la concentración celular de hierro dado por DMT1 sin IRE. DMT1 realiza transporte activo acoplado a protón, depende del potencial de membrana de la célula y del intercambiador Na+/H+ intestinal 3 (NHE3) responsable de generar la concentración de protones necesaria para su función.

Para el transporte de hierro por DMT1, se requiere que el hierro se encuentre en su forma Fe^{2+}. Para ello, la enzima Citocromo Reductasa B Duodenal (DCyTB, Duodenal Cytochrome B) produce esta reducción del hierro luminal. Esta actividad reductasa se ve complementada por la existencia de otras hierro-reductasas presentes a nivel de membrana apical y por la presencia de ácido ascórbico, un conocido potenciador de la absorción de hierro, por su capacidad de donar electrones a nivel intracelular, confiriéndole una alta capacidad reductora (Figura 8.2).

2.3.2. Receptor para Transferrina

El Receptor para transferrina (RTf) es una macromolécula central para la regulación de la homeostasis del hierro. El RTf es una glicoproteína de transmembrana tipo 2, de aproximadamente 180 kDa. Es una proteína homodimérica, dónde cada monómero se conforma por 780 aminoácidos. Los monómeros se encuentran unidos por dos puentes disulfuro y cada monómero del RTf tiene la capacidad de unir una molécula de Tf. El RTf se expresa en los enterocitos de las criptas duodenales regulando la absorción del hierro de la dieta. Sin embargo, todas las células animales expresan el RTf, principalmente las células hepáticas, de la placenta y en progenitores eritroides, exceptuando a los eritrocitos maduros. La estructura del RTf presenta una región extracelular con 3 dominios;

un dominio de unión a proteasas, un dominio apical y un dominio helical; una región transmembrana y una región citoplasmática (extremo amino terminal).

La membrana basolateral participa en dos procesos relacionados con el metabolismo de hierro: (a) en la transferencia del hierro desde el enterocito al plasma a través del transportador Ferroportina 1 y la oxidasa hefestina. (Figura 8.2). El hierro que no es exportado al plasma es almacenado en la proteína de almacenamiento Ferritina y posteriormente se pierde por exfoliación de las células intestinales. Las proteínas relacionadas al metabolismo del hierro en esta membrana, tanto en el precursor como en el enterocito maduro, son sensibles a los depósitos de hierro del cuerpo y (b) en la captación de Fe sistémico (transferrina-Fe) por el RTf. Cuando el hierro corporal se encuentra normal o aumentado, el RTf une Transferrina-Fe^{3+} (Tf-Fe). A pH 7,4 el RTf posee una baja afinidad por la apo-Tf, media por la Tf mono-férrica y cuatro veces más elevada por la Tf di-férrica ($2\text{-}7*10^{-9}$ M). Así, se forma el complejo ternario RTf-Tf-Fe, en la superficie de la membrana basolateral y se produce su internalización a través de un proceso endocítico. Una vez en la vesícula endocítica y por efecto del pH (aproximadamente 5,5-6,0), el complejo RTf-Tf-Fe libera el Fe al lumen de la vesícula. El complejo RTf-Tf es estable a este pH y es reciclado a la membrana y así queda disponible para realizar un nuevo ciclo. El Fe de la vesícula endocítica es transportado al citosol de la célula intestinal por el transportador DMT1 y pasa a formar parte del "pool" de Fe común de la célula. Este proceso aumenta el contenido intracelular de Fe de la célula y, por lo tanto, cambia la actividad de las proteínas reguladoras de Fe (Figura 8.2). En la célula eritroide, el Fe liberado probablemente forma parte del "pool" de hierro que va al interior de la mitocondria para la síntesis del heme o para la inserción del heme en proteínas, enzimas dependientes del heme o para ser almacenado en la Ferritina. Cuando el hierro alcanza la membrana mitocondrial interna es atrapada por ligandos y es transferido a través de la membrana interna por la ferroquelatasa. Solo la forma reducida del hierro (Fe^{2+}) puede ser procesada por la ferroquelatasa.

El hierro, en células no eritroides, modula la expresión del RTf de una manera "feedback" negativo, sin embargo, en células que sintetizan hemoglobina los niveles de RNAm son solamente afectadas por una alta concentración de hierro. El grupo hem baja los niveles de RNAm del receptor para transferrina y una vez que es sintetizado, el hem es transportado rápidamente fuera de la mitocondria para combinarse con las cadenas de la globina en el citosol. Cuando la síntesis del hem es inhibida en las células eritroides, muy poco o ningún hierro es acumulado en el citosol como Ferritina, en contraste con células no eritrocitarias, en que el exceso de hierro es necesariamente metabolizado formando Ferritina. Un defecto en la síntesis del hem explica la formación de sideroblastos en anillo en pacientes con anemia sideroblástica.

Algunos factores que serían causantes de la acumulación de Fe no hem en las mitocondrias de los eritroblastos son: (a) El hierro no puede ser usado por falta de protoporfirina IX, y (b) El hierro puede abandonar la mitocondria solo cuando es incorporado a la protoporfirina IX y forma el hem.

La diferenciación eritrocitaria es activada por la eritropoyetina (EPO) que lleva a una inducción de la transcripción de todas las enzimas de la vía del hem que ocurren coordinadamente con la inducción de los receptores de la transferrina. Además, la disponibilidad de transferrina está sujeta a los niveles de hierro en la síntesis eritrocitaria.

2.3.3. Proteína HFE

La proteína HFE es el producto de expresión del gen de la hemocromatosis hereditaria (HH). La proteína HFE es una glicoproteína de transmembrana tipo 1, de 343 aminoácidos. Esta proteína es homóloga a las moléculas MHC clase I; pero existen diferencias, ya que las moléculas MHC clase I participan en el sistema inmune presentando el péptido antigénico a las células T, en cambio, la proteína HFE no une péptidos ni realiza funciones inmunes. Estructuralmente, la HFE presenta tres dominios extracelulares (α1, α2 y α3), una región transmembrana y una pequeña región citoplasmática. Los dominios α1 y α2 se forman por 8 cadenas β-plegadas y dos α-hélice, los cuales se ubican en la superficie del dominio α3, el cual se une a través de un puente de disulfuro a la proteína β2-Microglobulina (β2m) en la superficie celular. La β2m le sirve a la proteína HFE de anclaje a la membrana plasmática y así poder ejercer su efecto regulatorio. La ausencia del puente disulfuro, por la mutación C282Y en su secuencia, impide de la unión de estas dos proteínas y la pérdida de la función de la proteína HFE.

La proteína HFE interactúa con el complejo RTf-Tf-Fe al pH de la superficie de la célula (pH 7,4). Por lo tanto, se forma un complejo cuaternario (HFE-RTf-Fe-Tf), el cual es endocitado y al pH endosomal el hierro se libera desde la transferrina; esta última se transforma en apotransferrina unida al RTf, que se recicla a la superficie celular donde en el pH básico de la sangre gatilla su disociación. La molécula de HFE se disocia del RTf en el interior del endosoma y se piensa que la HFE induce cambios estructurales que facilitan la liberación del hierro del complejo Fe-Tf a pH ácido.

Además del complejo cuaternario, se puede formar otro complejo; en el cual a cada cadena del homodímero del RTf, se une una molécula de HFE para formar un complejo simétrico doble, donde hay amplios contactos entre las dos cadenas polipeptídicas del dímero RTf, pero no hay contacto entre las dos moléculas de HFE. Los contactos intermoleculares primarios son entre los dominios α1-α2 de la HFE y las hélices 1 y 3 del dominio helical del RTf formando un centro estable. Los dominios α3 y α2m de la HFE que no hacen contacto con el RTf, son más móviles.

La proteína Tf se une a la región correspondiente al dominio helical del RTf y la molécula de HFE se une también a la misma zona, es decir, ambas moléculas compiten por el mismo sitio en el RTf. La evidencia estructural y bioquímica de que la proteína HFE y el complejo Fe-Tf se unen al mismo sitio en el RTf sugiere que este receptor con dos moléculas de Tf-Fe no podría unir HFE. Asimismo, el

complejo HFE-RTf con una estequiometría 2:2 no podría unir Fe-Tf. Con esto se sugiere que la proteína HFE puede competir eficazmente con la Tf-Fe a pesar de la gran concentración fisiológica de este. En solución lo que predomina es el complejo cuaternario HFE-RTF-Tf-Fe.

Algunas funciones de la proteína HFE en condiciones normales son: (a) participar en la captación del hierro celular; (b) participar en la liberación del hierro intracelular ya sea disminuyendo la afinidad del RTf y c) anular la endocitosis del RTf.

La hemocromatosis hereditaria (HH) es un desorden caracterizado por un incremento en la captación de hierro dietético y un incremento de la tasa de transferencia de hierro hacia la sangre, lo que conduce a una sobrecarga de hierro. Esto se debe a una disminución en la expresión de la proteína HFE funcional. Dos mutaciones principales dan cuenta del 90% de la hemocromatosis hereditaria. La primera es la mutación de la cisteína 282 por una tirosina (C282Y) en el dominio α3. Esta mutación impide que la chaperona β2-microglobulina se una a la proteína HFE y por lo tanto esta no es transportada hasta la membrana basolateral de la célula del epitelio intestinal, donde realiza su actividad. La segunda mutación corresponde a un cambio de la histidina 63 por un ácido aspártico (H63D), en el dominio α1. Esta mutación disminuye la afinidad de la proteína HFE por el receptor para transferrina. Se han postulado tres posibles mecanismos de acción de la proteína HFE: (1) gracias a que la proteína HFE presenta afinidad por el RTf, compitiendo con la Tf, disminuyendo así la absorción de hierro sistémico; (2) A nivel del endosoma bloquearía al transportador DMT1, inhibiendo así la liberación de Fe desde la vesícula endocítica al citoplasma y (3) por un proceso de transitosis, la proteína HFE llega a la membrana apical y ahí inhibe al transportador DMT1. Esto implicaría que HFE actuaría como una proteína sensible a los niveles de depósitos de hierro del organismo. Además, se señala que las concentraciones relativas de HFE y RTf serían importantes para la carga de hierro, y por lo tanto su relación es fundamental para el mantenimiento de la homeostasis del hierro. También se ha demostrado que la proteína HFE incrementa la actividad de unión IREs-IRPs, lo que ejerce un control universal sobre la regulación de hierro celular.

2.3.4. Transportador Ferroportina 1

Otro elemento que participa en la homeostasis de Fe es el transportador Ferroportina 1, también denominado Ireg1 (Iron-Regulated Transporter 1) o proteína transportadora de metales (MTP1). Este transportador exporta Fe^{2+} y Zn^{2+} pero no otros metales divalentes (tales como Mn, Cu o Cd). La localización de Ferroportina 1 en las células y tejidos es consecuente con su función de exportación de hierro desde las células. En el duodeno está presente en los enterocitos maduros y ausente en las criptas (Figura 8.2). En el hígado se encuentra preferentemente en las células de Küpffer, y esto podría explicar porque en individuos con hemocromatosis hereditaria las células de Küpffer contienen bajos niveles de hierro en comparación con el resto de las células del hígado.

El ARNm del transportador Ferroportina 1 posee en su región 5' un sitio IRE para la unión de las IRPs. Por esto se sugiere que este RNAm sería inhibido en condiciones de hierro intracelular disminuido. En individuos hipotransferrémicos la Ferroportina 1 se encuentra elevada a nivel duodenal, debido a que estos individuos al presentar una anemia severa, necesitan un aumento rápido en la carga de hierro, que se obtiene mediante la estimulación del transportador por reguladores eritropoyéticos. La hipoxia aumenta la expresión del RNAm de Ferroportina 1 en enterocitos y macrófagos mediado principalmente por HIF2α. La degradación de HIFs depende de las concentraciones de hierro y oxígeno, por lo que las concentraciones de HIF2α podrían aumentar en condiciones de deficiencia de hierro o hipoxia aumentando la expresión de este transportador. Se postula además que a nivel duodenal existirían dos transcritos para Ferroportina 1, el ARNm que contiene IRE y otra variante carente de este elemento, lo que explicaría en parte el aumento de la expresión focalizada de este último cuando existe una deficiencia de hierro a nivel intestinal. Su regulación post-traduccional es principalmente mediada por la hormona hepcidina (ver más abajo). Esta hormona, se une al transportador inhibiendo su actividad transportadora e induciendo su internalización y posterior degradación en compartimientos lisosomales. Por lo tanto, el efecto de la regulación por la Hepcidina, es una disminución de la salida del hierro desde las células hacia la circulación.

2.3.5. Hefestina

La proteína Hefestina (proteína homóloga a la ferroxidasa multicobre Ceruloplasmina) de peso molecular aproximado de 130 kDa y con un dominio transmembrana en el extremo C-terminal, se localiza en la membrana basolateral del enterocito, asociada al transportador Ferroportina 1 (Figura 8.2). El transportador le entrega a la Hefestina Fe^{2+}, y esta se encarga de su oxidación a Fe^{3+}. Una vez oxidado el hierro y en el plasma es unido por la transferrina plasmática (Tf-Fe), que lo transporta por la circulación hacia los distintos tejidos.

Tanto la Hefestina como ceruloplasmina requieren de cobre para ser enzimáticamente funcionales, lo que explicaría en parte la deficiencia en la absorción de hierro cuando existe deficiencia de cobre. La anemia ligada al sexo (SLA) es un desorden que se caracteriza por una sobrecarga de hierro en el enterocito y una cantidad disminuida en el plasma, producida por una inhibición en la exportación del hierro a través de la membrana basolateral. En la SLA, la Hefestina se encuentra mutada (deleción del aminoácido 194 de la proteína), lo que produce la inhibición de la oxidación del hierro, disminuyendo así, el Fe disponible para ser transportado por la transferrina. En modelos animales de SLA, este tipo de anemia se resuelve a medida que crece el animal acompañado de la presencia de actividad ferroxidasa en la membrana duodenal de estos, lo que sugiere que existen otras ferroxidasas que complementarían la actividad de Hefestina.

2.3.6. Hepcidina

La Hepcidina (Hepc) es una hormona sintetizada principalmente en el hígado y tejido adiposo. Es un péptido catiónico rico en cisteínas, que fue detectado primeramente en la orina, en donde se observó que presentaba una actividad anti-microbiana. Existen dos formas predominantes de Hepcidina, Hepc20 y Hepc25, ambas presentan 8 cisteínas conectadas por enlaces disulfuros intramoleculares, la porción -NH_2 terminal es altamente conservada y esencial para la función e interacción con Ferroportina 1. El péptido es sintetizado como un pro-péptido de 84 aminoácidos, pero solamente las formas de 20 y 25 aminoácidos son activas y purificadas a partir de orina.

La Hepcidina tiene un rol regulador en el tráfico de hierro. Su expresión se ve disminuida en condiciones de deficiencia de este metal o en condiciones que requieren una gran cantidad de hierro disponible (eritropoyesis aumentada, embarazo y lactancia). Por el contrario, se presenta en mayor expresión de la hormona cuando existe un exceso de hierro, disminuyendo la absorción intestinal y promoviendo su almacenamiento principalmente en macrófagos y hepatocitos. Además, se ha determinado que su expresión aumenta en condiciones de inflamación (tal como la que se produce en la obesidad) y en estados infecciosos.

Se ha observado que un amplio rango de Proteínas Morfogénicas Óseas (BMPs, Bone Morphogenetic Proteins) estimula la transcripción del gen que codifica para la Hepcidina *(Hamp)*, siendo la BMP6 la isoforma más relevante *in vivo.* Su expresión en células hepáticas no parenquimatosas ocurre en respuesta al almacenamiento de hierro en hepatocitos y en enterocitos debido al hierro dietario. Esta proteína actúa a través del receptor BMP el cual activa la vía de señalización multifuncional SMAD (Small Mother Against Decapentaplegic), formando un complejo transcripcionalmente activo que involucra al factor co-SMAD, SMAD4, lo que llevaría al aumento de expresión de *Hamp*. Por otro lado, la proteína Hemojuvelina (HJV), cuya mutación se relaciona con la hemocromatosis tipo 2 o juvenil, actúa como un co-receptor de esta vía y se ha observado que Hepcidina se encuentra disminuida o ausente en esta patología, lo que apoya la idea de que HJV se encuentra implicada en la expresión de hepcidina. HJV existe de forma soluble (HJVs) y unida a membrana. Aparentemente HJVs actuaría como un inhibidor de la vía BMP/SMAD al competir en la unión con la proteína unida a membrana. La presencia de la HJVs depende de la proteasa Furin, cuyos niveles aumentan en condiciones de deficiencia de hierro e hipoxia. Existen otros dos componentes que regulan esta interacción HJV-BMPs-BMP/SMAD: (a) La Neogenina, proteína de membrana que actuaría estabilizando la unión HJV-BMPs e inhibiría a la forma soluble de HJV y (b) La matriptasa 2, proteasa que se encuentra unida a la membrana y es codificada como *TMPRSS6*, que tiene como sustrato a la HJV. Una vez que hemojuvelina es proteolizada por esta enzima no puede actuar como co-receptor, lo que implicaría que matriptasa 2 actuaría como un represor de la expresión de hepcidina.

Otro mecanismo de regulación de la expresión de la Hepc, involucra a las proteínas HFE y al RTf2. La proteína HFE se une a RTf1 compitiendo con la transferrina en la unión al receptor. El RTf2 se expresa predominantemente en hepatocitos y eritroblastos y une con una menor afinidad a la transferrina, pero a diferencia de RTf1, une a la Tf y a HFE de forma simultánea. Si se presenta una condición de sobrecarga de hierro, la Tf-Fe desplazaría a HFE de la unión con RTf1 y se uniría a RTf2. El complejo HFE/RTf2 junto con la Tf-Fe_2 aumentaría la síntesis de hepcidina a través de la vía BMP/SMAD. Por otro lado, se disminuiría la respuesta de la eritropoyetina en las células eritroides. Lo contrario ocurriría en una condición de deficiencia de hierro. Todo esto convertiría a este sistema en un sensor de la condición de hierro en el organismo.

Actualmente se postula que entre otros factores que regularían la expresión de hepcidina, se encuentran: (a) la eritroferrona, proteína que es liberada por precursores eritroides estimulados por eritropoyetina, inhibiendo la síntesis de hepcidina y permitiendo la obtención de hierro necesaria para la síntesis de hemoglobina. (b) El factor de diferenciación y crecimiento 15 (GDF15) y la proteína de gastrulación retorcida 1 (TWSG1), ven aumentada su expresión al aumentar la tasa eritropoyética y pueden inhibir la expresión de hepcidina en hepatocitos. Existiría una interacción cruzada (cross talk) entre estos factores y la vía SMAD ya que se requiere de una vía funcional para observar dichos efectos regulatorios. (c) Durante el proceso de inflamación, la inter leuquinas 6 (IL6) induce la expresión de hepcidina. Este proceso estaría mediado por la señalización de la vía JAK2-STAT3, la que tendría una interacción cruzada con BMP/SMAD, debido a que se requiere de un sitio de unión funcional para SMAD en el promotor de *Hamp* en la regulación por IL-6. Este último mecanismo es especialmente relevante, ya que por la presencia de inflamación (especialmente de tipo media y crónica, como la observada en la obesidad) y posterior inducción de la Hepc, se puede producir una disminución de los niveles circulantes de hierro, produciendo la denominada anemia de las enfermedades crónicas.

El mecanismo por el cual la hepcidina ejerce su efecto sobre la absorción intestinal a nivel sistémico es a través de la modulación de la actividad del transportador Ferroportina 1 en la membrana basal de los enterocitos, en los hepatocitos y macrófagos, principalmente. La Hepc se une al transportador ferroportina 1 en la membrana, inhibiendo su actividad y posteriormente induciendo su endocitosis y posterior degradación del transportador en los lisosomas (Figura 8.2). De esta manera, la interacción hepcidina-ferroportina 1 regula eficientemente el flujo de hierro desde la célula hacia el plasma y el hierro almacenado en todos los tejidos que lo absorben. De forma similar, se ha postulado que podría regular la actividad de DMT1, aunque las evidencias experimentales aún son escasas.

2.3.7. Transportador de hierro hemínico: HCP1

El hierro hemínico, es la principal forma funcional de Fe en las células eucariontes. En los mamíferos, el 60% del Fe total es Fe hemínico. El grupo heme es parte de grupos prostéticos de la hemoglobina, mioglobina, citocromos, catalasa,

peroxidasa y óxido nítrico sintasa y también participa en procesos metabólicos como la transcripción, traducción y diferenciación celular. El hierro hemínico proveniente principalmente de las carnes rojas es captado en parte por: (a) a través de endocitosis mediada por receptor; (b) difusión pasiva o (c) transporte activo, saturable y dependiente de la temperatura, indicativo de un transportador. Este último sería realizado por el transportador HCP1 (Hem Carrier Protein 1) presente en la membrana apical del enterocito. El transportador HCP1 es codificado en el cromosoma 17q11.1 y codifica para una proteína de 459 aminoácidos (Figura 8.2). Este transportador fue primeramente descrito como un transportador de entrada de folato de alta afinidad, acoplado a protones (PCFT/SLC46A1) Una vez en el citoplasma (o vesícula endocítica), el grupo porfirínico es degradado por la enzima hem oxigenasa. En esta reacción enzimática, se libera CO (que actúa como segundo mensajero), biliverdina y Fe. La absorción intestinal del hierro hemínico se realizaría en tres etapas: (1) captación apical desde el lumen del hierro en el grupo heme. (2) catabolismo intracelular realizado por la enzima heme oxigenasa, la cual libera CO, biliverdina y Fe libre, y (3) exportación del hierro liberado o del grupo heme íntegro a través de la familia de transportadores FLVCR.

2.4. Modelo de homeostasis del hierro

La regulación de la homeostasis del hierro comienza en las criptas, que presentan el complejo HFE-RTf, pero no DMT1. Debido a esto no son sensibles a los niveles de hierro en el lumen intestinal. Esta regulación es mediada por reguladores de depósito de hierro corporal y por el regulador eritropoyético, quienes comunicarían a través del plasma el estado de repleción/depleción de hierro y eritropoyesis que presenta el organismo, ayudado por la capacidad del duodeno de aislar las señales que pudiesen confundir, tales como el "pool" de hierro lábil del lumen intestinal o en tránsito en el estrato epitelial. Además, estos reguladores tienen la capacidad de estimular, mediante señales externas, a los enterocitos diferenciados.

El nivel del "pool" de hierro reactivo cumple un rol regulador clave en la actividad de unión de las proteínas IRP a los elementos IREs de los mRNA, en la modulación del tráfico post-traduccional dependiente de hierro, y en eventos de degradación. Así la expresión de proteínas que participan en el metabolismo de Fe dependerá en parte del "pool" de hierro lábil que exista en la célula precursora.

Este modelo de homeostasis de hierro puede explicarse mejor utilizando como ejemplo lo que sucede en individuos con HH, en donde se observa un alto nivel de "pool" de hierro lábil producida por un aumento en la captación por DMT1 y un aumento en la exportación por el transportador Ferroportina 1 y una disminución de niveles de Ferritina. Si la exportación por el transportador Ferroportina 1 sobrepasa al de captación por DMT1, los niveles de Ferritina y "pool" de hierro lábil se encontrarán disminuidos, estimulando la actividad de unión de los complejos IRP/IREs, lo que conduce a un mayor aumento en la proteína DMT1 (Figura 8.3). La disminución del "pool" de hierro lábil puede redistribuir a DMT1 a la membrana apical desde vesículas endocíticas.

Un mejor entendimiento de la homeostasis de hierro en el intestino ocurrirá con la identificación de los reguladores eritroides y depósitos de hierro del cuerpo y una mayor caracterización de los mecanismos por los cuales ellos regulan los transportadores de hierro, así como de otras proteínas relacionadas con hierro tales como HFE y Hefestina.

2.5. Biosíntesis del Hem

El grupo hem (hierro protoporfirina IX) es esencial para todas las células y funciona como el grupo prostético de numerosas hemoproteínas, tales como la hemoglobina, mioglobina, citocromos respiratorios, citocromos P450 (CYP), catalasa, peroxidasa, triptófano pirrolasa y óxido nítrico sintasa. La principal producción diaria de heme proviene de la médula ósea para cumplir con la hemoglobinización de los glóbulos rojos. El grupo hem sintetizado en el hígado se requiere principalmente para los CYP (principalmente en el retículo endoplásmico). En el grupo hem, el átomo de Fe^{2+} tiene 6 pares de electrones, 4 están unidos a los nitrógenos de los anillos pirrólicos de la porfirina, dejando dos pares de electrones desocupados, uno arriba y otro debajo del plano del anillo de porfirina. Uno de ellos se coordina con un residuo de histidina de las cadenas de globina y el otro sitio de coordinación se usa para unir al oxígeno.

Los dos componentes principales de la síntesis de hemoglobina son la producción de globina y la síntesis del grupo hem. La síntesis de las cadenas de globina se produce en el citosol de los eritrocitos. La presencia de heme induce la transcripción del gen de la globina. Por otro lado, la síntesis del grupo hem se produce tanto en el citosol como en las mitocondrias de los eritrocitos. Comienza con glicina y succinil coenzima A y termina con la producción de un anillo de protoporfirina IX. La unión de la protoporfirina a un ion Fe^{2+} forma la molécula de hem final.

La vía de biosíntesis del hem es probablemente idéntica en todas las células de los mamíferos, esta vía involucra 8 enzimas, 4 de ellas se encuentran en el citoplasma y las otras 4 en las mitocondrias. Brevemente, el primer paso ocurre en la mitocondria e involucra la condensación de glicina con succinil CoA formando el ácido δ-5 aminolevulínico (ALA), esta reacción es catalizada por la enzima aminolevulínico sintetasa (ALAS). Los siguientes 4 pasos de la vía tienen lugar en el citoplasma, la ALA deshidratasa (ALAD) convierte a 2 moléculas de ALA en porfobilinógeno (PBG). Los dos pasos enzimáticos siguientes convierten a cuatro moléculas de PBG en una estructura cíclica tetra-pirrólica llamada uroporfirinógeno III, el cual es descarboxilado formando el coproporfirinógeno III. El tercer paso final incluye la inserción de una molécula de Fe^{2+} en la protoporfirina IX por la enzima mitocondrial ferroquelatasa, etapa que ocurre entonces en la mitocondria.

3. LECTURAS SUGERIDAS

Arredondo M, Kloosterman J, Núñez S, Segovia F, Candia V, Flores S, Le Blanc S, Olivares M, Pizarro F. Heme Iron Uptake by Caco-2 Cells is a Saturable, Temperature Sensitive and Modulated by Extracellular pH and Potassium. Biol Trace Elem Res 125:109-119, 2008. doi. 1007/sl201l-008-8161-4.

Arredondo M, Muñoz P, Mura C, Núñez MT. DMT1, a physiologically relevant apical Cu+1 transporter of intestinal cells. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 284: C1525-C1530, 2003.

Bennett M, Lebrón J, Bjorkman P. Cristal structure of the hereditary haemochromatosis protein HFE complexed with transferrin receptor. Nature 403: 46-52, 2000.

Cindy N, Roy CA. Iron homeostasis: new tales from the crypt. Blood, 96: 4020-4025, 2000.

Collins JF, Flores SRL, Wang X, Anderson GJ. En Physiology of the Gastrointestinal Tract (Sixth Edition). Chapter 60 Mechanisms and Regulation of Intestinal Iron Transport. Pages 1451-1483, 2018. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809954-4.00060-8.

Ganz T. Systemic iron homeostasis. Physiol. Rev. 93(4): 1721-1741, 2013.

Ginzburg YZ. Hepcidin-ferroportin axis in health and disease. Vitam. Horm. 110:17-45, 2019. doi: 10.1016/bs.vh.2019.01.002.

Gregory J Anderson, David M Frazer, Current understanding of iron homeostasis. Am. J. Clin. Nutr. 106(suppl_6): 1559S–1566S, 2017. https://doi.org/10.3945/ajcn.117.155804.

Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. Cell. 142(1):24-38. 2010. doi: 10.1016/j.cell.2010.06.028.

Le Blanc S, Garrick MD, Arredondo M. Heme carrier protein 1 transports heme and is involved in heme-Fe metabolism. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 302: C1780–C1785, 2012. doi:10.1152/ajpcell.00080.2012.

Mendiburo MJ, Le Blanc S, Espinoza A, Pizarro F, Arredondo M. Transepithelial heme-iron transport: effect of heme oxygenase overexpression. Eur. J. Nutr. 50:363–371, 2011, doi: 10.1007/s00394-010-0144-5.

Muckenthaler MU, Rivella S, Hentze MW, Galy B. A Red Carpet for Iron Metabolism. Cell. 168(3):344-361, 2017. doi: 10.1016/j.cell.2016.12.034.

Nemeth E, Ganz T. Regulation of iron metabolism by hepcidin. Annu. Rev. Nutr. 26:323-342, 2006. doi: 10.1146/annurev.nutr.26.061505.111303.

Núñez MT, Gárate M, Arredondo M, Tapia V, Muñoz P. The cellular mechanisms of body iron homeostasis. Biol. Res. 33: 133-142, 2000.

Núñez MT, Núñez C, Tapia V, Muñoz P, Mazariegos D, Arredondo M, Mura C, Maccioni R. Iron-activated iron uptake: a positive feedback loop mediated by iron regulatory protein 1. BioMetals 16: 83-90, 2002.

Phillips JD. Heme biosynthesis and the porphyrias Mol Genet Metab. 128(3): 164–177, 2019. doi:10.1016/j.ymgme.2019.04.008.

Shayeghi M, Latunde-Dada G, Oakhill J, Laftah A, Takeuchi K, Halliday N. et al. Identification of an intestinal heme transporter. Cell 122(5):789-801, 2005.

Silva B, Faustino P. An overview of molecular basis of iron metabolism regulation and the associated pathologies. Biochim. Biophys. Acta. 1852(7):1347-1359, 2015. doi: 10.1016/j.bbadis.2015.03.011.

Tabushi M, Yoshimori T, Yamagishi K, Yoshida T, Kishi F. Human NRAMP2/DMT1, wich mediates iron transport across endosomal membranes, is localized to late endosomes and lysosomes in Hep-2 cells. J. Biol. Chem. 275: 22220-22228, 2002.

Wang J, Pantopoulos K. Regulation of cellular iron metabolism. Biochem. J. 434(3):365-381, 2011. doi:10.1042/BJ20101825.

Wang CY, and Babitt JL. Liver iron sensing and body iron homeostasis. Blood. 133(1): 18–29. 2019. doi: 10.1182/blood-2018-06-815894.

SECCIÓN 1.3 **SERIE BLANCA**

Capítulo 9. Neutrófilos y Monocitos

Capítulo 10. Linfocitos

Capítulo 11. Eosinófilos y Basófilos

Capítulo

9

NEUTRÓFILOS Y MONOCITOS

Carolina Espinoza, Iván Palomo, Diego Méndez, Eduardo Fuentes y Marcelo Alarcón.

Resumen

1. Introducción

2. Leucocitos
- 2.1. Generalidades sobre hematopoyesis
- 2.2. Neutrófilos
  - 2.2.1. microRNA (miRNA)
- 2.3. Monocitos y células relacionadas
  - 2.3.1. Monocitos
  - 2.3.2. Macrófagos
  - 2.3.3. Células dendríticas
  - 2.3.4. miRNA

3. Lecturas sugeridas

RESUMEN

Los glóbulos blancos o leucocitos incluyen linfocitos, granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y monocitos, que se forman en la médula ósea a partir de células pluripotentes, en un proceso finamente regulado y con la participación de diversas citoquinas y receptores para las mismas.

Las células del Sistema Fagocítico Mononuclear (monocitos, macrófagos y células dendríticas) tienen como función fagocitar y presentar antígenos a las células T.

Los granulocitos presentan particularidades morfológicas y funcionales. La principal función de los neutrófilos es su capacidad fagocítica. En el capítulo se explican los procesos de activación, quimiotaxis, fagocitosis y bacteriolisis.

En el punto 2 del capítulo se describe la estructura y función de los diferentes tipos de leucocitos, y su número en sangre de individuos normales, lo cual se debe tener en cuenta al momento de interpretar los resultados de hemograma en diferentes patologías hematológicas, tanto malignas como no malignas.

1. INTRODUCCIÓN

Los leucocitos forman parte del sistema inmune, el que se incluye entre los mecanismos biológicos destinados a mantener la organización estructural y funcional de los individuos y está genéticamente programado para la neutralización y eliminación, tanto de agentes infecciosos, células y moléculas extrañas como de detritus celulares y células propias envejecidas, alteradas o transformadas.

El sistema inmune es, por lo tanto, esencialmente destructivo y requiere de un sofisticado mecanismo de regulación que permita responder agresivamente contra lo extraño o contra lo propio envejecido, alterado o transformado (**concepto de inmunidad**) al tiempo que se reconoce, se acepta, se tolera o no se destruye lo propio normal (**concepto de tolerancia**).

En este capítulo se revisan las características fundamentales de los glóbulos blancos y la forma como ellos se organizan en los distintos tejidos y órganos asociados al sistema inmune.

2. LEUCOCITOS

El sistema inmune está constituido por células y mediadores solubles producidos por estas células (Tabla 9-1). El primer paso en el desarrollo de una res-

puesta inmune es siempre el reconocimiento de aquello que debe ser eliminado (y que genéricamente se denomina antígeno), por receptores específicos que existen en la membrana de las células inmunocompetentes.

Las células del sistema inmune incluyen tanto linfocitos T, linfocitos B y células NK, como células inflamatorias y diferentes células fagocíticas o endocíticas especializadas en la captura, procesamiento y presentación de antígenos.

Desde un punto de vista funcional, las células y mediadores solubles del sistema inmune se han separado tradicionalmente, en componentes naturales o innatos (Inmunidad Innata) y componentes específicos, adquiridos o adaptativos (Inmunidad Adquirida), que han desarrollado receptores y mecanismos distintos para el reconocimiento inmunológico. Así, mientras el componente adquirido se ha desarrollado en torno al tamaño y diversidad de nuestro repertorio linfocitario (estimado en 10^{18} linfocitos T y 10^{14} linfocitos B) que confiere una capacidad virtualmente ilimitada para reconocer y eliminar miles de millones de antígenos distintos, el componente natural o innato se ha desarrollado en torno a unos pocos receptores (PRR: "PAMP Recognition Receptor") que reconocen patrones moleculares propios de los agentes infecciosos (PAMP: "Pathogen Associated Molecular Pattern") o patrones moleculares propios de células propias envejecidas, transformadas o tumorales (ACAMP: "Apoptosis Cell Associated Molecular Pattern").

Tabla 9-1. Componentes del sistema inmune

Células	Mediadores solubles
Linfocitos T y Linfocitos B*	Anticuerpos*
Células NK (células "natural killer")	Sistema del Complemento
Células dendríticas	Citoquinas y Quimioquinas
Monocitos y Macrófagos	Proteínas catiónicas
Neutrófilos	Radicales libres
Eosinófilos	
Basófilos	
Mastocitos	
Células epiteliales	
Células endotetiales	
Otras células	

*, son las únicas células o mediadores solubles antígeno-específicos

Desde un punto de vista estructural en cambio, los componentes celulares del sistema inmune pueden separarse en dos compartimientos distintos y finamente regulados, que difieren en su organización celular y en las estrategias utilizadas en la resistencia a agentes infecciosos, en la captura y presentación de antígenos y en la distinción entre agentes dañinos y substancias inocuas: (a) **el**

Compartimiento sistémico, que incluye médula ósea, bazo y ganglios linfáticos y, (b) **el Compartimiento epitelial**, que incluye tejido linfoide asociado a la piel (SALT: "Skin Associated Lymphoid Tissue"), a mucosas (MALT: "Mucosal Associated Lymphoid Tissue") y a glándulas secretoras (glándulas lagrimales, glándulas salivales y glándulas mamarias).

La especificidad de la respuesta inmune, reside siempre en los linfocitos T y linfocitos B y la eliminación del antígeno puede hacerse en forma directa mediante una respuesta celular citotóxica (respuesta celular) o de manera indirecta a través de la síntesis y secreción de anticuerpos específicos, que reclutan y activan mecanismos accesorios de eliminación (respuesta humoral). Las células accesorias (células NK, fagocitos, células inflamatorias y otras células) cumplen, en cambio, importantes funciones efectoras en la inmunidad innata y en el procesamiento y presentación de antígenos durante la inmunidad adquirida.

2.1. Generalidades sobre hematopoyesis

Durante la vida fetal la hematopoyesis ocurre en el hígado y en el bazo. A partir del nacimiento se suspende el proceso en estos órganos y se incrementa la actividad de la médula ósea, iniciada en los últimos meses de gestación. En la médula ósea, las células se desarrollan en un espacio tridimensional y en constante comunicación y dinámica interacción de las células hematopoyéticas troncales (HSCs: "Hematopoietic Stem Cells") con las células estromales del entorno local, mediante factores solubles (factores de crecimiento, citoquinas y quimioquinas) o contactos célula-célula.

Las células hematopoyéticas troncales son elementos centrales en la formación de celulas sanguíneas a lo largo de nuestra vida. Sus capacidades de autorrenovación y multipotencialidad permiten su diferenciación en distintas líneas celulares (linfocitos, células mieloides o eritrocitos) en los órganos hematopoyéticos que proporcionan el entorno celular y molecular requerido en el proceso:

(a) la estructura anatómica y disposición tridimensional de vasos sanguíneos y diferentes compartimientos celulares; y (b) estroma tisular, que incluye diversos tipos celulares (fibroblastos, adipocitos, macrófagos, linfocitos y células endoteliales de los sinusoides) y macromoléculas de la matriz extracelular (colágeno, fibronectina, laminina, hemonectina, tenascina, trombospondina y proteoglicanos).

La proliferación y diferenciación celular en la médula ósea, depende de la interacción entre células hematopoyéticas progenitoras y células estromales de soporte, que proporcionan los factores de crecimiento CSF, citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión requeridas en el proceso y en la organogénesis de los órganos linfoides secundarios, tales como linfonódulos, Placas de Peyer, el compartimiento linfoide del bazo (pulpa blanca) y el tejido linfoide asociado a mucosas.

Para el desarrollo de linfocitos en la médula ósea, la diferenciación a partir de HSC debe pasar por un tipo celular intermedio denominado progenitor linfoide común (CLP: "common lymphoid progenitor"), en el cual el programa de diferenciación en células mieloides o eritroides se ha apagado.

Al parecer la subdivisión del potencial de la célula hematopoyética precursora en los compartimientos linfoide, mieloide o eritroide depende de la expresión de los factores de transcripción PU.1 y GATA-1.

GATA-1 es un regulador positivo del desarrollo eritroide, que bloquea los programas linfoide y mieloide antagonizando con PU.1 Cuando la expresión de GATA-1 está reprimida la expresión del programa linfoide o mieloide dependerá de los niveles de expresión de PU.1. Altos niveles promueven la diferenciación mieloide activando la expresión de receptores para citoquinas mieloides y bloqueando la expresión de citoquinas y sus receptores linfocides (como por ejemplo, IL-7 y su receptor IL-7R).

Una vez que han abandonado el órgano linfoide primario, los linfocitos T (Timo) y linfocitos B (Médula ósea) recircularán a través de los órganos linfoides secundarios (incluyendo ganglios linfáticos y placas de Peyer), en búsqueda de antígenos.

En la médula ósea las células hematopoyéticas se distribuyen en tres compartimientos morfo-funcionales: (a) compartimiento de células madres, (b) compartimiento mitótico o de división y (c) compartimiento de maduración – almacenamiento.

Las células del compartimiento "stem cell" (de células madre) corresponden a menos del 1% de las células de la médula. No son identificables morfológicamente, por lo que deben ser estudiadas en cultivos *in vitro*. La "stem cell" o célula madre pluripotente, también denominada CFU-ML ("Unidad formadora de colonias mieloides y linfoides") tiene la capacidad de dividirse y autoperpetuarse. Da origen a dos líneas celulares principales, mieloide y linfoide. En la línea mieloide, a partir de la CFU-GEMM (granulocítica, eritroide, monocítica y megacariocítica) se producen dos diferentes CFU "encomendadas", CFU-GM (granulocito, monocito) y CFU-MegE (megacariocito, eritroide); posteriormente se generan las CFU-G, CFU-M, CFU-E, CFU-Meg.

En el compartimiento mitótico, a partir de las CFU de las líneas celulares específicas antes mencionadas, se generan las primeras células reconocibles morfológicamente de cada línea celular: mieloblasto en el caso de los granulocitos, que posteriormente madurará a promielocito y luego a mielocito etapa en la cual se diferencian las tres líneas específicas de los granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos); las etapas posteriores de maduración de los granulocitos corresponden a juveniles, baciliformes y segmentados. Por su parte, la serie monocítica madura en las etapas de monoblasto y monocito. De la CFU-Meg, en la línea megacariocítica se reconoce las etapas de megacarioblasto, megacario-

cito y plaquetas; por su parte en la serie eritroblástica se reconocen las etapas, proeritroblasto, eritroblasto basófilo, eritroblasto poliromatófilo, eritroblasto ortocromático, reticulocito y glóbulo rojo. En la línea linfoide, a partir de la CFU-L, después de un proceso de diferenciación y maduración se originan los linfocitos T y linfocitos B.

En el proceso de diferenciación y maduración de las diferentes líneas celulares, participan varios factores de maduración y citoquinas secretadas por células del estroma. Existen factores que actúan sobre progenitores de multilinaje: "Kit ligand", GM–CSF (CSF: Factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos), G-CSF (CSF de granulocitos), IL-3 (IL= Interleuquina), IL-4, IL-6, IL-11, IL-12, "Flt-3 ligand", Factor inhibidor de leucemia (LIF), Oncostatin (OSM). Algunos de estos factores participan también en la maduración de algunas líneas celulares en particular. Entre los factores de maduración de los granulocitos y monocitos, se reconocen a GM-CSF; G-CSF favorece la maduración a neutrófilos, M-CSF a monocitos, IL-5 a eosinófilos y "Kit ligand" a basófilos. Por su parte, el regulador fisiológico de la maduración eritroide es la eritropoyetina (EPO) y de los megacariocitos la trombopoyetina (TPO) también denominada "mpl-ligand". "Kit ligand" también parece tener participación en la maduración eritroide. En la línea linfoide B, que a diferencia de los linfocitos T, maduran en la médula ósea, el factor de maduración es la IL-7. Las células de las diferentes líneas hematopoyéticas presentan receptores para los factores de maduración antes nombrados.

2.2. Neutrófilos

En la serie granulocítica, a partir del estadio madurativo de mielocito se reconocen tres líneas celulares diferentes: neutrófilos, eosinófilos y basófilos. En la Tabla 9-2 se muestra el porcentaje que cada una de estas líneas celulares ocupa entre los leucocitos en los adultos y el número absoluto que representa.

Tabla 9-2. Número y porcentaje de leucocitos en personas adultas normales.

Tipo de célula	%	x10^3/µL
Leucocitos (totales)		4 - 10
Neutrófilos	60-65	2 - 7
Eosinófilos	0-4	0 - 0,4
Basófilos	<1	0,1 - 1
Monocitos	4-10	0,2 - 0,8
Linfocitos	20-25	1,5 - 3,5

En los adultos, los neutrófilos maduros representan aproximadamente el 65% de los 4-10 x 10^3/µL glóbulos blancos de la sangre.

Los neutrófilos tienen un diámetro de 10-15 µm y un núcleo segmentado con 2-5 lóbulos (Figura 9-1). En su citoplasma se han descrito cuatro tipos de gránulos, los primarios o azurófilos, secundarios (específicos), terciarios y vesículas secretoras (Tabla 9-3). Los **gránulos primarios**, emergen en la etapa de promielocito y son escasos en los estadios maduros, y contienen enzimas y proteínas microbicidas (entre otras, peroxidasa, lisozima, proteínas catiónicas) proteínas (elastasa, catepsina G y otras proteínas) e hidrolasas ácidas (entre otras, N-acetilglucuronidasa y catepsinas B y D). Los **gránulos secundarios**, emergen en la etapa de juvenil (memamielocito) y son los más numerosos en los neutrófilos maduros; contienen lisozima, colagenasa, fosfatasa alcalina, lactoferrina y otras enzimas y proteínas. Los **gránulos terciarios** contienen principalmente gelatinasa. Las **vesículas secretoras**, al parecer formadas por endocitosis, en la etapa madura de los neutrófilos, contienen algunas proteínas plasmáticas.

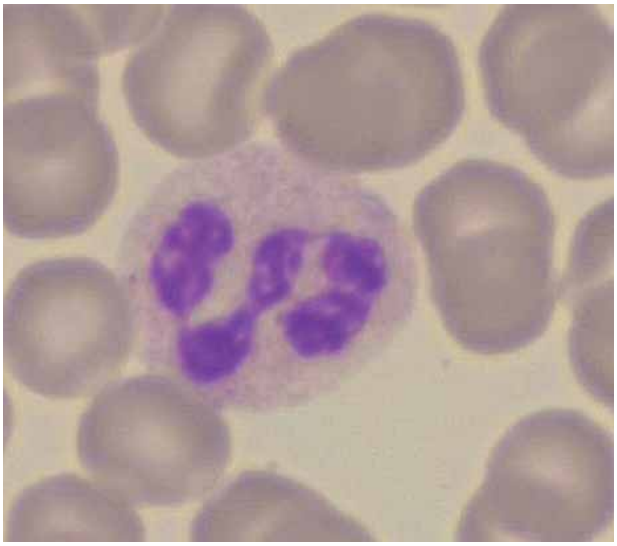


Figura 9-1. Microfotografía de granulocitos maduros. Los neutrófilos son células de 10-15 µm. Debido al pH neutro de su citoplasma y contenido granular, estos no se tiñen con la clásica tinción hematológica de May Grünwald-Giemsa. Una característica de los neutrófilos maduros es su núcleo segmentado.

Tabla 9-3. Contenido de los gránulos de los neutrófilos humanos

	Gránulos primarios	Gránulos secundarios	Gránulos terciarios	Vesículas secretoras
Membrana		CD11b (Mac-1)	CD11b (Mac-1)	CD11b (Mac-1)
		Citocromo b_{558}	Citocromo b_{558}	Citocromo b_{558}
		Receptor de FMLP	Receptor de FMLP	Receptor de FMLP
		Receptor de laminina	Receptor de laminina	
		Receptor de uPA		Receptor de uPA
	CD63	CD15		Fosfatasa alcalina
	CD66c	CD66a		CD10, CD13, CD45
	CD68	CD666		CD16
		Receptor de Fibronectina		DAF (CD55)
		Subunidad α de Proteína G		CR1 (CD35)
		Antígeno NB1		
		RAP1, RAP2		
		Receptor de Trombospondina		
		Receptor de TNF		
		Receptor de Vitronectina		
Matriz				
Agentes microbicidas				
	Lisozima	Lisozima	Lisozima	
	Mieloperoxidasa	Colagenasa		
	Defensinas			
	Proteínas catiónicas			
	Proteína bactericida permeabilizante (BPI)			
Proteasas	Elastasa			
	Catepsina G			
	Proteinasa 3			
Hidrolasas ácidas	N-Acetilglucuronidasa			
	Catepsinas B y D			
	β-Glucuronidasa			
	β-Glicerofosfatasa			
	β-Galactosidasa			
	β-Glucosaminidasa			
	α-Fucosidasa			
	α-Manosidasa			
	N-Acetil-β-glucosaminidasa			

Otros	Sialidasa	Sialisidasa		
	Azurocidin	Pro-uPA		Pro-uPA/uPA
	Ácido mucopolisacárido	Apolactoferrina	Gelatinasa	Proteínas plasmáticas:
	Proteína ligante de heparina	β_2-Microglobulina	Acetiltransferasa	Tetranectina,
	Factor inactivador de C5a	Histaminasa		Albúmina,
		Heparinasa		Otras
		Proteína ligante de Vitamina B12		
		Inhibidor de proteína Kinasa C		
		Otros		

FMLP, péptido formil-metil-leu-phe; uPA, Activador del plasminógeno tipo uroquinasa.

Algunas moléculas expresadas en la membrana de los neutrófilos son: (a) moléculas de adhesión, entre ellas LFA-1 (CD11a), Mac-1 (CD11b), p150, 95 (CD11c), β_2- integrina (CD18), ICAM-3 (CD50), L-selectina (CD62b), (b) receptores: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16), Receptor para C5a (CD68), receptor para G-CSF (CD114), (c) ectoenzimas: aminopeptidasa N (CD13, inactiva IL-8), endopeptidasa (CD10, inactiva FMLP) y (d) otros: "Decay accelerating factor" (DAF, CD55), y Antígeno lencocitario común (CD45).

Una vez que los neutrófilos salen de la médula ósea, permanecen en circulación aproximadamente 7 horas, para luego pasar al azar a los tejidos, donde permanecen vivos 2-3 días. La producción y destrucción diaria de neutrófilos es de $0{,}9x10^9$/Kg de peso.

Para que los neutrófilos puedan cumplir su función de fagocitar y destruir las partículas ingeridas deben movilizarse al foco infeccioso, fagocitar y destruir el contenido:

a) Quimiotaxis

El movimiento de los neutrófilos al sitio de infección es dirigido por un gradiente químico (**quimiotaxis**). Entre otros factores quimiotácticos, para los que estos leucocitos poseen receptores, destacan algunas proteínas del complemento (C5a, C3a), péptidos formilados (Ej. N-formil-met-leu-phe, FMLP) y lípidos derivados de las bacterias, factor plaquetario 4 (PF4), metabolitos de la vía de la lipoxigenasa del metabolismo del ácido araquidónico, especialmente el leucotrieno B4 (LTB4), y las llamadas quimioquinas, entre ellas la IL-8. Varios de estos factores han sido clonados y secuenciados.

Los factores quimiotácticos actúan a bajas dosis (0,1-1 mM). El efecto biológico de los factores quimiotácticos es lograr una migración dirigida de los neutrófilos. La respuesta leucocitaria a los factores quimiotácticos es regulada positiva

o negativamente por varios estímulos fisiológicos y farmacológicos. Varias citoquinas, como por ejemplo, TNFα e IFNγ favorecen la quimiotaxis. En el caso del IFNγ participa aumentando la hidrólisis de fosfatidilcolina por la fosfolipasa D. La desensibilización celular al estímulo del factor quimiotáctico puede ocurrir por aumento de AMPc (AMP cíclico) o degradación del factor quimiotáctico.

Adhesión de neutrófilos al endotelio

Para que los neutrófilos lleguen a los tejidos infectados, junto con recibir la señal quimiotáctica, estos deben unirse al endotelio, luego rodar sobre este ("rolling"), sufrir un proceso de activación adicional y luego participar de un proceso de migración transendotelial. En este proceso tienen importante participación algunas moléculas de adhesión celular, expresadas en forma constitutiva e inducida en la membrana de los neutrófilos y células endoteliales.

Aproximadamente la mitad de los neutrófilos circulantes forman parte del "pool" marginal, que mantienen interacción intermitente con el endotelio. Las moléculas de adhesión de la familia selectinas (L-selectinas, CD62L en leucocitos y E-selectinas, CD62E en células endoteliales) y sus ligandos, carbohidratos sialilados, son responsables del "rolling" de los neutrófilos sobre el endotelio. La interacción de los factores quimiotácticos con sus respectivos receptores inicia el proceso de transducción de señales en los neutrófilos, lo que inicialmente se asocia con expresión de moléculas de adhesión de la familia integrinas, especialmente LFA-1 (CD11a-CD18) que se une a su ligando de la superfamilia de las inmunoglobulinas ICAM-1 (CD54) en las células endoteliales. Este último tipo de interacción resulta en un marcado incremento de la adhesión de los neutrófilos al endotelio y término del "rolling". Luego los neutrófilos migran entre las células endoteliales al tejido.

b) Fagocitosis

La fagocitosis es un proceso que realizan diversos tipos celulares que van desde células epiteliales a fibroblastos y células del sistema inmune como monocitos-macrófagos, neutrófilos y células dendríticas, que son conocidas como fagocitos profesionales. El primer paso en la fagocitosis es el reconocimiento de partículas, agentes infecciosos o células por receptores de la membrana celular. En metazoos la fagocitosis es importante en la remoción de células apoptóticas durante el desarrollo y remodelamiento tisular. En mamíferos es importante en la inmunidad innata y en la inmunidad adquirida y contribuye en nuestra habilidad para combatir agentes infecciosos. El proceso de formación del fagosoma a nivel superficial, y su transformación en fagolisosoma es complejo e implica uniones ligando-receptor, transducción de señales de activación, rearreglos locales del citoesqueleto en el sitio de internalización, y una serie dinámica de fusión/fisión de membrana y eventos de remodelación.

Receptores que participan en la fagocitosis

Una etapa inicial de la fagocitosis es el reconocimiento, por parte de la célula fagocítica, de la partícula a ser fagocitada. Para ello las células fagocíticas poseen 2 grupos de receptores, según lo que son capaces de reconocer: (a) ligandos propios de los organismos o células a fagocitar y (b) moléculas que se han unido a ellas y que favorecen la fagocitosis (opsoninas).

Entre los receptores que unen moléculas no opsónicas y que se presentan fundamentalmente los macrófagos, se encuentran: (i) los **receptores "scavenger"** que unen varios ligandos, entre otros, proteínas modificadas, polianiones (incluye ácidos nucleicos), fosfolípidos ácidos (incluye lipopolisacárido de bacterias Gram negativas y ácido lipoteicoico de bacterias Gram positivas y (ii) el **receptor de manosa**, que une carbohidratos.

Entre los receptores de opsoninas, se distinguen: (i) los **receptores de fragmento Fc de IgG** (FcγR) e IgA (FcαR) unidos a un dímero de cadenas γ, los receptores del complemento y otros receptores (de colectinas y de proteínas plasmáticas). Los receptores de Fc son miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas, con 3 (FcγRIA) o 2 (otros receptores Fc) dominios tipo inmunoglobulina extracelulares, un dominio transmembrana y una corta cola citoplasmática; FcγRIIIB, unido a glicofosfatidilinositol (GPI), es una excepción. En la Tabla 9-4 se muestran los diferentes FcγR y el FcαR, indicando las células que los presentan.

Tabla 9-4. Receptores de la región Fc de IgG e IgA

Receptor	CD	Células
FcγRI*	CD64	Monocitos, macrófagos, Neutrófilos maduros tratados con IFNγ
FcγRIIA	CD32	Neutrófilos maduros, monocitos Macrófagos, plaquetas
FcγRIIB	CD32	Monocitos, macrófagos Linfocitos B, mastocitos
FcγRIIIA	CD16	Macrófagos, células NK Mastocitos
FcαR	CD89	Granulocitos, monocitos Macrófagos

* Tres locus génicos; I, alta afinidad; II, afinidad intermedia; III, baja afinidad

Los receptores del complemento incluyen CR1, una proteína de transmembrana que une C3b, y dos integrinas CD11b/CD18 y CD11c/CD18, también llamadas CR3 y CR4, respectivamente. Estos dos últimos receptores unen iC3b, molécula derivada de C3b y se une covalentemente a la superficie celular.

Otros receptores unen un grupo de moléculas llamadas colectinas, entre ellas la proteína que une manosa (MBL), molécula que participa en la activación del sistema del complemento y la proteína C reactiva (PCR) que se puede unir por ejemplo al carbohidrato C del *Streptococcus pneumoniae*. Además, también existen receptores para algunas proteínas plasmáticas que se pueden unir a los microorganismos, por ejemplo, receptores para fibrinógeno y fibronectina.

Transducción de señales en la fagocitosis

Se describirá el mecanismo de transducción de señales asociados a la fagocitosis mediada por FcγR. Los receptores FcγRI, FcγIIA y FcγIIIA comparten la capacidad para activar la cascada de tirosina kinasa. Los dominios ITAM ("inmune-tyrosine activation motifs") de la cadena γ de los receptores FcγR pueden ser fosforilados por tirosina kinasa de la familia SyK. Esta etapa es fundamental para la ingestión y la polimerización de actina. Paralelamente, la unión ligando-receptor activa la **fosfolipasa C** la cual desdobla el fosfatidil inositol-4,5-difosfato (**PIP_2**) en inositol-1,4,5-trifosfato (**IP_3**) y diacilglicerol (**DAG**). El IP_3 permite que se libere Ca^{2+} de los depósitos citoplasmáticos, el que permite dos acciones: (a) desencadena el ordenamiento de los filamentos de actina y de la proteína contráctil miosina, responsables del movimiento de los neutrófilos y (b) activa la **fosfolipasa A_2** que convierte los fosfolípidos de membrana en ácido araquidónico a partir del cual se obtienen otros metabolitos. El DAG activa la **proteína kinasa C** que fosforila proteínas que participan en los procesos de degranulación y secreción. La fosfolipasa D escinde fosfatidilcolina a ácido fosfatídico y colina; su activación se asocia a la unión de ligandos a receptores del complemento.

Endocitosis

La endocitosis, proceso por el cual el material es introducido en la célula, puede tomar la forma de una **pinocitosis** (bebiendo por células) y **fagocitosis** (comiendo por células). La pinocitosis se refiere a ingestión de macromoléculas y la fagocitosis es visible al microscopio óptico. Ambos procesos involucran invaginación de la membrana celular y la formación de vesículas o vacuolas (fagosomas). La mayoría de las células pueden realizar pinocitosis, pero la fagocitosis es un proceso característico de los neutrófilos, monocitos y macrófagos, y, en mucho menor grado, de los eosinófilos y basófilos.

La **fagocitosis** de los microorganismos se ve favorecida si estos están recubiertos (opsonizados) con IgG (subclases 1 ó 3) y/o fracciones del complemento (C3b y/o C4b). Los neutrófilos al igual que los monocitos y macrófagos, poseen receptores para la región Fc de IgG (FcγR) y para C3b y C4b (Tabla 9-5). La unión de estas opsoninas con el receptor respectivo, activa la célula fagocítica, esta

emite prolongaciones que engloban al microorganismo. El fagosoma formado por la membrana plasmática, posteriormente se fusiona con la membrana de los gránulos citoplasmáticos que descargan su contenido enzimático en el interior del fagosoma. El DAG, a través de la proteína kinasa C que fosforila proteínas, "gatilla" la degranulación.

Tabla 9-5. Receptores para inmunoglobulinas y fracciones del complemento en los granulocitos y monocitos/macrófagos.

	FcεRI	FcεRII	FcγRI	FcγRII	FcγRIII	C5aR	CR1	CR3
Neutrófilos	-	+	-	+	+	+	+	+
Eosinófilos	-	+	-	-	+	+	+	+
Basófilos	+	-	-	-	+	+	+	+
Monocitos/ macrófagos	?	-	+	+	+	+	+	+

$Fc_{\varepsilon}R$, Receptor para IgE (I, alta afinidad; II, afinidad intermedia); Fcγ, Receptor para IgG (I, alta afinidad; II, afinidad intermedia; III, baja afinidad); C5aR, receptor de C5a; CR1, receptor de C3b; CR3, receptor de iC3b.

Antes se indicó el contenido de cada uno de los tres tipos de gránulos de los neutrófilos (Tabla 9-3). Así por ejemplo los gránulos azurófilos contienen componentes antibacterianos; también contienen elementos como elastasa que puede favorecer el movimiento de los neutrófilos al hidrolizar algunos componentes de la matriz extracelular. Los gránulos secundarios son liberados más fácilmente de los neutrófilos, conteniendo entre otras moléculas, algunas que activan el sistema del complemento. También contienen colagenasa, que al igual que la elastasa puede favorecer el movimiento de las células fagocíticas. Por otra parte, la apolactoferrina al unir hierro puede tener un efecto antimicrobiano, entre otras razones por privar de este elemento a las bacterias. Por su parte, la gelatinasa contenida en los gránulos terciarios puede participar, junto a otros componentes, en la modificación de la matriz extracelular durante el desplazamiento de los neutrófilos. En otro orden, proteínas de membrana de los gránulos terciarios y de las vesículas secretoras, pueden aumentar su expresión en la superficie celular, después de la activación.

Mecanismos microbicidas

Una vez fagocitados los microorganismos, estos son destruidos por mecanismos dependientes e independientes del oxígeno, también denominados mecanismos oxidativos y no oxidativos, respectivamente (Tabla 9-6). Ambos mecanismos a menudo participan en forma sinérgica.

Tabla 9-6. Mecanismos antimicrobianos de los neutrófilos

Dependientes del oxígeno
Mediados por mieloperoxidasa
Ácido hipocloroso (HOCl)
Independientes de mieloperoxidasa
Peróxido de hidrógeno (H2O2)
Ión superóxido (O2-)
Independientes del Oxígeno
pH ácido
Lisozima
Lactoferrina
Defensinas
Proteína bactericida permeabilizante (BPI)
Proteínas catiónicas de los gránulos

a) Mecanismos antimicrobianos dependientes del oxígeno. Durante la fagocitosis, proceso dependiente de energía, se produce un aumento del consumo de oxígeno, de la oxidación de la glucosa y de la producción de metabolitos del oxígeno, fenómeno también denominado "estallido respiratorio". La generación de dichos metabolitos se debe a la activación de la NADPH oxidasa que al oxidar el NADPH reduce el oxígeno molecular a ión superóxido (O^-_2), el que se convierte en peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Los metabolitos del oxígeno pueden actuar a través de un mecanismo dependiente o independiente de mieloperoxidasa (MPO), enzima presente en alta concentración en los gránulos primarios, los que son degranulados al interior del fagosoma. La MPO, en presencia de un ión haluro como Cl- (o Br-), transforma el H_2O_2, generado por mecanismos dependientes de oxígeno en ácido hipocloroso (HOCl), un potente oxidante y antimicrobiano, (antibacteriano, antifúngico, antiviral y antimicoplasma). Los radicales superóxido e hidroxilo, por sí solos tienen acción microbicida.

La oxidasa dependiente de NADPH, es un complejo multienzimático que incluye dos proteínas de membrana (de dos tipos de gránulos: vesículas secretoras y gránulos secundarios) y tres citosólicas, cuando la célula está en reposo. El componente de membrana es un heterodímero formado por una proteína de 91 kDa (gp91phox) y una proteína de 22 kDa (p22phox). Estas proteínas, junto con flavin adenin dinucleótido (FAD) forman un flavocitocromo denominado citocromo b_{558}. Adicionalmente en la membrana participa una proteína de unión de nucleótidos de guanina denominada rap1. La subunidad de 91 kDa presenta el sitio de unión para el NADPH. Ambas subunidades presentan grupos HEME. El componente citoplasmático está formado por tres proteínas independientes: p40phox, p74phox y p67 phox. Además, participa otra proteína de unión de

nucleótidos de guanina, rac2; en reposo une GDP y cuando la célula es activada une GTP.

Precozmente durante la activación, las vesículas secretoras y posteriormente los gránulos secundarios, se fusionan con la membrana plasmática, la cual durante la fagocitosis se invagina y por tanto la membrana de los fagosomas presentará las proteínas de membrana de la NADPH oxidasa. Como consecuencia de la activación de los neutrófilos, proceso en que p47phox es fosforilada, las proteínas citosólicas son translocadas a la membrana plasmática, formándose y activándose el complejo NADPH oxidasa.

La enfermedad granulomatosa crónica es una inmunodeficiencia primaria, causada por mutaciones que producen una pérdida o inactivación de una de las subunidades principales de la NADPH oxidasa.

b) Mecanismos antimicrobianos independientes del oxígeno. Estos mecanismos funcionan en ausencia de metabolitos del oxígeno, situación que se presenta en un ambiente anaeróbico. En los mecanismos no oxidativos participan proteínas y enzimas presentes en los gránulos citoplasmáticos de los fagocitos (tabla 9-3). Entre otros componentes de estos mecanismos destacan: (a) la **lisozima**, enzima catiónica que destruye el péptidoglican de la pared celular, principalmente de las bacterias Gram positivas; (b) la **proteína bactericida permeabilizante** (BPI), proteína catiónica que permeabiliza la membrana bacteriana; (c) la catepsina G, una serino proteasa con actividad sobre bacterias Gram negativas y (d) las **defensinas**, péptidos de 29-34 aminoácidos, ricos en arginina y cisteína, y que presentan actividad microbicida sobre bacterias Gram positivas, Gram negativas, hongos y algunos virus.

Una vez muertas las bacterias en el interior de los fagolisosomas, son degradadas por **hidrolasas ácidas**, que por la generación de ácido láctico durante la glicólisis, encuentran su pH óptimo para actuar.

2.2.1. microRNA (miRNA)

En cuanto a la biología de los neutrófilos, los miRNA que regulan la hematopoyesis y el desarrollo de los neutrófilos son bien conocidos. Sin embargo, solo unos pocos miRNA se caracterizan en el contexto de los estudios de migración y activación de neutrófilos por pérdida de función. Se han definido alrrededor de 86 miRNA relacionados con la función de los neutrófilos, entre los que destacan el hsa-miRNA-125a-5p, hsa-miRNA-19a, hsa-miRNA-18a, hsa-miRNA-17, hsa-miRNA-18a, hsa-miRNA-92a, hsa-miRNA-17, hsa-miRNA-92a y hsa-miRNA-20a. Estos regulan diversos genes que participan en la maduración y función de los neutrófilos, como por ejemplo los genes CHC1L y H1FX que participan en el remodelamiento de cromatina que son indispensables para la función del neutrófilo, otros genes involucrados serían los que regulan la cascada se señales MAPK/ERK, la cual tendría implicancia en la homestasis del citoesqueleto, el cual participa en funciones de diapedesis y “rolling”, entre otras.

2.3. Monocitos y células relacionadas

Dada su relación ontogénica, y sus características estructurales y funcionales, a los monocitos y macrófagos se les agrupa en el denominado Sistema fagocítico mononuclear (SFM), antes llamado sistema retículo endotelial. Se describirá en este punto a las células dendríticas (DC, "Dendritic Cells") por su origen común, aunque no son principalmente fagocíticas.

Las células del SFM presentan un amplio espectro de funciones: (a) remoción de células muertas, senescentes, extrañas, y alteradas; (b) regulación de la función de otras células; (c) procesamiento y presentación de antígenos; (d) participación en reacciones inflamatorias; (e) destrucción de microorganismos y (f) destrucción de células neoplásicas.

2.3.1. Monocitos

Los monocitos presentan un diámetro de 12-15 µm (Figura 9-2) y representan un 4-10% de los leucocitos sanguíneos (Tabla 9-2). En su citoplasma tienen gránulos azurófilos o primarios que contienen hidrolasas ácidas, que junto con los mecanismos oxidativos, participan en la destrucción de las partículas fagocitadas; al respecto es válido lo que será descrito antes para los neutrófilos.

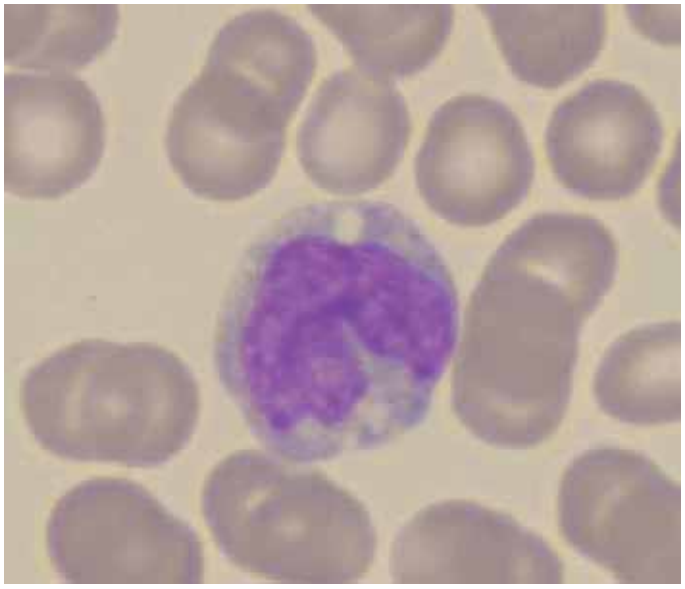


Figura 9-2. Microfotografía de un monocito. Los monocitos son precursores sanguíneos de los macrófagos tisulares. Presentan un núcleo excéntrico arriñonado.

Después de salir de la médula ósea los monocitos circulan aproximadamente 8 horas; al igual que los neutrófilos, en la sangre se reconocen dos compartimentos, circulante y marginal; luego pasan a los tejidos donde se transforman en macrófagos. En relación con los monocitos, los macrófagos son de mayor tama-

ño y presentan mayor capacidad fagocítica y microbicida. Pueden permanecer vivos entre algunos meses y años. Se encuentran en varios órganos, destacando su presencia en el hígado (células de Kupffer), riñones, pulmones (macrófagos alveolares e intersticiales), serosas (peritoneal y pleural) bazo, ganglios linfáticos, cerebro, aparato reproductivo (testículo, ovario, útero, oviductos), hueso (osteoclastos) e intestino; también se encuentran en la leche materna.

a) Receptores de fagocitos mononucleares

Los macrófagos y monocitos presentan una gama importante de receptores: para la región Fc de las inmunoglobulinas, complemento, lipoproteínas, citoquinas y factores quimiotácticos, entre otras moléculas (Tabla 9-7).

Tabla 9-7. Receptores de macrófagos y monocitos

Receptores de Inmunoglobulinas	
	FcγRI (CD64)
	FcγRII (CD32): A, B y C
	FcγRIII (CD16): A y B
	FcεRI
	FcεRII
	FcεRIII (CD23): A y B
	FcαR
Receptores del Complemento	
	CR1 (CD35)
	CR3 (CD11b/CD18)
Receptores de Citoquinas	
	TNF-R
	IL-1R
	M-CSFR
	IFNγR
Receptores de factores quimiotácticos	
	De péptidos formilados
	De quimioquinas
	De C5a
Receptor de lipopolisacárido (CD14)	
Receptores de lipoproteínas	
	LDL-R
	Receptor “scavenger” (de LDL modificada)
Receptores de hormonas	
	De Glucocorticoides
	De Insulina
	De Estrógenos
	Otras hormonas
Receptor de transferrina	
Receptor de lactoferrina	
Receptor de fibronectina	

Las **Moléculas de Adhesión Celular (CAM)** participan en las uniones célula-célula y célula-matriz. En los monocitos y macrófagos, entre otras moléculas de adhesión se han descrito las moléculas LFA-1 (CD11a/CD18), Mac-1 (CD11b/CD18) y p150,95 o CR1(CD11c/CD18) de la familia integrinas y las moléculas CD2 e ICAM-1 (CD54) de la superfamilia de las inmunoglobulinas (SFIg).

2.3.2. Macrófagos

Los macrófagos pueden ser residentes (fijos en tejidos) o libres. Entre los primeros destacan:

Macrófagos intestinales. Los macrófagos se encuentran principalmente en la lámina propia del tracto gastrointestinal. Las áreas corticales ricas en linfocitos asociados a intestino (GAL) y las placas de Peyer contienen muy pocos macrófagos. Respecto a su función, podrían participar en la presentación antigénica, y en la fagocitosis de bacterias y células muertas.

Macrófagos del hígado. Las células de Kupffer se ubican en las paredes vasculares de los sinusoides hepáticos. Pueden fagocitar un espectro amplio de células y partículas, entre ellos, liposomas, bacterias, parásitos, virus, glóbulos rojos y plaquetas opsonizadas con IgG y/o complemento.

Macrófagos cerebrales. Estos macrófagos son llamados células microgliales. Su función es participar en la inducción de la respuesta inmune y modular la función neuronal.

Macrófagos peritoneales. Estos se encuentran entre los macrófagos de serosas; tienen capacidad para destruir células neoplásicas y bacterias. En casos de peritonitis o ascitis maligna aumenta el número de macrófagos.

Macrófagos de órganos reproductivos. Los testículos contienen un gran número de macrófagos. Pueden participar en la fagocitosis de espermios moribundos no eyaculados y en la destrucción de microorganismos. En los ovarios los macrófagos pueden participar en la fagocitosis de células degenerativas del cuerpo lúteo.

Macrófagos del hueso. Los osteoclastos se encargan de la resorción ósea, se encuentran principalmente en las trabéculas del hueso esponjoso. Además, se encargan de la detección, fagocitosis, destrucción de bacterias y otros elementos dañinos, también pueden presentar antígenos a las células e iniciar el proceso inflamatorio mediante la liberación de citoquinas, que pueden activar diferentes células.

Macrófagos del tejido conjuntivo: Corresponden a los histiocitos. Procesan y presentan antígenos a linfocitos inmunocompetentes.

Macrófagos renales. Son las células mesangiales de los glomérulos renales. Su función al igual que en otros tejidos es de fagocitosis y presentar los antígenos a las células del Sistema Inmune.

Los macrófagos libres están situados en órganos linfoides secundarios (macrófagos de los sinusoides esplénicos y de los senos medulares en los ganglios linfáticos), allí atrapan material extraño.

Los macrófagos tienen una vida media mucho más larga que los neutrófilos en los tejidos, pudiendo ser meses e incluso años.

Una subpoblación de los monocitos y macrófagos, expresa en su superficie moléculas MHC de clase II, que participan en la presentación del antígeno a los linfocitos T "helper". Por otra parte, sintetizan y secretan citoquinas como interferón (IFN) α y β, IL-1 y factor de necrosis tumoral (TNF).

2.3.3. Células dendríticas

Las células dendríticas (DC) residen en la periferia y actúan como centinelas del sistema inmune monitoreando el microambiente tisular periférico y capturando antígenos en el contexto de receptores PAMP. Debido a su capacidad migratoria única, las células dendríticas pueden transportar antígenos desde la periferia a los órganos linfoides secundarios donde, luego de su maduración, procesarán y presentarán fragmentos antigénicos estimulando la activación y diferenciación de linfocitos T-antígeno específicos. Injuria tisular, infecciones y otros factores que alteren la homeostasis tisular periférica, proporcionarán señales de peligro que conducen a la producción local de citoquinas proinflamatorias y movilización de células DC a los órganos linfoides secundarios. En estos órganos la síntesis y secreción concomitante de IL-12 estimulará la diferenciación de linfocitos Th1. Dosis bajas de LPS (lipopolisacáridos) de bacterias gram negativas favorecen el desarrollo de una respuesta Th2, mientras la exposición a altos niveles de LPS la suprime. La inhalación de bajas dosis de LPS a nivel respitarorio induce migración y maduración de DC y el desarrollo de una respuesta Th2. La inhalación de altos niveles de LPS induce respuesta Th1 y la inhalación de antígenos purificados no induce migración de DC a ganglios linfáticos y por lo tanto ocurre respuesta celular T. Junto a monocitos, macrófagos y linfocitos B, las DC forman la subpoblación de células presentadoras de antígeno profesionales. Sin embargo, las DC presentan la mayor capacidad y eficiencia en el inicio y en la modulación de la respuesta inmune. Morfológicamente se caracteriza por la presencia de prolongaciones alrgadas que salen del cuerpo celular.

Durante su maduración, las DC sufren una serie de cambios inmuno-funcionales que les permite una mejor adaptación a las circunstancias o eventos inmunológicos, así consiguen una mayor especialización en sus funciones de presentación antigénica y de proporcionar señales accesorias de coestimulación a los linfocitos T.

Se ha demostrado la existencia de distintas líneas de DC, con diferentes estadios madurativos y vías de migración, lo que implica una distribución anatómica diferente. A partir de la célula pluripotencial CD34+ y en presencia de GM-CSF y TNFα se diferencia en: (a) CD1α+, CD14-, de las que se originan las células de Langerhans (DC de la piel) y (b) CD1α-, CD14+ que dan origen a las DC mieloides. Las células de Langerhans se trasladan hacia tejidos no vascularizados como la epidermis en la piel, y las DC mieloides lo hacen hacia zonas vascularizadas, localizándose en los intersticios (DC intersticiales). Una vez que las células de Langerhans han incorporado el antígeno en la piel, migran por la linfa hacia los ganglios linfáticos donde lo presentan a las LT; las DC intersticiales, por su parte, migran hacia el bazo a través de la sangre.

La maduración de las DC es fundamental en la iniciación de la respuesta imune. Los estudios de maduración *in vitro* de las DC se realizan a partir de monocitos obtenidos de sangre periférica e incubados en presencia de GM-CSF e IL-4; se obtiene así una población de **DC inmaduras**, células que expresan en su superficie moléculas MHC clase II en baja densidad, receptor de manosa, quimioquina CCR5 y FcR, y no expresan la molécula de adhesión ICAM-1 y molécula coestimuladora B7. En el paso a DC maduras participan LPS, y citoquinas como IL-1 y TNFα. **Las DC maduras** expresan en su superficie altos niveles de moléculas MHC clase II, moléculas coestimulatorias (CD40, CD86/B7-2 y B7-1), moléculas de adhesión (ICAM-1 y LFA-3) y receptores para quimioquinas como CCR7.

In vivo, factores, tanto de tipo infecciosos como inflamatorios, influyen en estimular la maduración y el movimiento de las DC hacia los tejidos linfoides secundarios.

2.3.4. miRNA

Los miRNA desempeñan funciones críticas en muchos procesos biológicos al controlar la expresión génica a nivel postranscripcional. Parecen afinar la respuesta inmunitaria al dirigirse a moléculas reguladoras clave, y su expresión anormal se asocia con trastornos inflamatorios mediados por el sistema inmunitario. Se han encontrado nueve miRNAs (miRNA-132, miRNA-106a, miRNA-19b, miRNA-18b, miRNA-20b, miRNA-146a, miRNA-342-3p, miRNA17, y miRNA18a). Estos regularían proteínas importantes como GTPasas de la familia Rho (Rho GTPasas) y la señalización de la proteína Sema4D. El tráfico de monocitos hacia los tejidos requiere la activación de integrinas a través de la transducción de señales inducida por Rho GTPasas como RHOA o RAP1, lo que da como resultado la adhesión celular a la pared de los vasos sanguíneos. Las Rho-GTPasas son reguladores clave de la dinámica celular de la actomiosina y, por lo tanto, restringen la motilidad de los monocitos, en los trastornos inflamatorios. La proteína Sema4D pertenece a una gran familia de proteínas unidas a la membrana denominadas Semaforinas que participan en numerosas funciones, incluida la guía de axones, la morfogénesis, la carcinogénesis y la inmunomodulación; Sema4D, en particular, influye en la migración de monocitos.

3. LECTURAS SUGERIDAS

Babior, B., "NADPH oxidase: An update", *Blood*, 93(5):1464-1476, 1999.

Degos, L., Linch, C., Löwenberg, B., **Textbook of Malignant Haematology**, Chapters 3, 4, Martin Dunitz, 1999.

Gartner, L. y Hiatt, J., Traducido por Sapiña, S., **Histología, texto y atlas**, Capítulos 10 y 12, Interamericana, 1997.

Geneser, F., **Histología: sobre bases moleculares**, Capítulos 10, 11 y 16, Editorial Panamericana, 2001.

Hampton, M.; Kettle, A.; Winterbown, C., "Inside the neutrophil phagosome: oxidants, mieloperoxidase, and bacterial killing", *Blood*, 92(9): 3007 - 3017, 1998.

Herzog, E.L, Chai, L., Krause D.S. "Plasticity of marrow-derived stem cells". *Blood* 102(10): 3483-3493, 2003.

Lee, R., Foerter, J., Lukeng, J., Pareskevas, F., Greer, J., Rodgers, G. (eds), **Wintrobe's clinical hematology**, Chapters 8, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, Lippincott Willians E. Wilkins, Philadelphia, 1998.

Palomo, I., Pereira, J., Koenig, C. "Células y órganos del sistema inmune" En **Fundamentos de inmunología básica y clínica**, Palomo, I., Ferreira, A., Sepúlveda, C., Rosemblatt, M., Vergara, U., capítulo 3, Editorial, Universidad de Talca, 2002.

Paul, W., Editor, **Fundamental Inmunology** (Four Edition), Chapters 14, 30, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1999.

Pereira, J., "Producción, cinética y función de los granulocitos" En **Fisiología de la sangre** (Mezzano, D. y Pereira, J., Editores), capítulo 7, Editorial Universitaria, P. Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile, 1993.

Stiene-Martin, A., Lotspeich-Steininger, Ch., Koepke, J., **Clinical Hematology: Principles, procedures and correlations**, Second edition, Chapter 23, 1998.

Trambas, C.M. y Griffiths, G. "Delivering the kiss of death" *Nature Rev. Immunol.* 4:399-403, 2003.

Capítulo

10

LINFOCITOS

Ulises Vergara C., Iván Palomo G.

Resumen

1. Introducción

2. Estructura y función de linfocitos

3. Linfocitos B
3.1. Desarrollo de linfocitos B
3.2. Linfocitos B y respuesta inmune humoral

4. Linfocitos T
4.1. Receptor de linfocitos T
4.2. Subpoblaciones de linfocitos T

5. Células linfoides de la Inmunidad Innata

6. Memoria Inmunológica e Inmunidad de Entrenamiento

7. Lecturas sugeridas

RESUMEN

El sistema inmune está en constante adaptación para combatir amenazas externas e internas que pueden conducir a daño estructural y o funcional de nuestros órganos, tejidos y células.

El Sistema inmune está constituido por una enorme diversidad de células provistas de receptores, cuya afinidad y avidez resultan fundamentales en el reconocimiento y posterior eliminación específica de las amenazas o señales de peligro, externa e interna. Estas poblaciones celulares incluyen tanto aquellas que forman parte de la inmunidad innata (macrófagos, células natural killer, células dendríticas), como subpoblaciones de linfocitos T y linfocitos B, que forman parte de la inmunidad adquirida.

Los linfocitos pueden separarse en tres subpoblaciones estructural y funcionalmente distintas: linfocitos B, linfocitos T y los recientemente descritos linfocitos de la inmunidad innata o ILC por "Innate Lymphocyte Cells". En los órganos linfoides secundarios los linfocitos B y T maduros reconocen antígenos específicos y se desarrolla una respuesta inmune, humoral y celular, respectivamente. Los linfocitos ILC no presentan receptores que reconocen antígenos, pero si receptores de alta afinidad para citoquinas específicas.

1. INTRODUCCIÓN

En un individuo de cualquier especie, cada órgano, cada tejido y, finalmente, cada célula de ese órgano o tejido tiene una forma, un tamaño y una organización estructural y funcional que le es propia.

Este es el contexto en el que, el sistema inmune se define como parte de los mecanismos biológicos destinados a mantener la organización estructural y funcional de los individuos, puesto que debe protegerlos de los cambios o alteraciones que pueden producir daño tisular. Así, el sistema inmune es esencialmente destructivo y está genéticamente programado para la neutralización y eliminación, tanto de agentes infecciosos y de células y moléculas extrañas, como de detritus y productos moleculares de células propias envejecidas, alteradas o transformadas.

Esto implica, necesariamente, la existencia de un específico y sofisticado mecanismo de regulación, que permite responder agresivamente contra lo extraño (**concepto de Inmunidad**) o contra lo propio estresado, dañado, envejecido, alterado o transformado y, al mismo tiempo, reconocer, aceptar y tolerar "lo propio normal" (**concepto de Tolerancia**). Además, toda activación específica del sistema inmune va, inevitablemente, acompañada de un efecto secundario no deseado que implica inflamación y daño tisular inespecífico (**concepto de Hipersensibilidad**).

El sistema inmune está constituido por células que tienen la capacidad para reconocer, neutralizar y eliminar, células y moléculas extrañas y células y moléculas propias envejecidas, alteradas o transformadas. De esta manera, el primer paso en el desarrollo de una respuesta inmune, es siempre el reconocimiento de lo extraño, o de lo propio alterado, dañado o transformado, por receptores específicos, que existen en la membrana de las células inmunocompetentes.

Todas las células de nuestro organismo forman parte del sistema inmune y, en la población total de células de un individuo, pueden distinguirse, dos subpoblaciones celulares, estructural y funcionalmente distintas, células efectoras y población linfocitaria:

a) Células efectoras. Estas células, de manera natural, innata o constitutiva tienen la capacidad para reconocer y destruir aquello que debe ser eliminado (Respuesta Inmune Natural o Innata) Estas células efectoras están provistas de receptores que reconocen ligandos específicos,llamados patrones moleculares que se expresan en agentes infecciosos (**PAMPs, por Pathogen Associated Molecular Patterns:** Lipopolisacárido de bacterias Gram negativas, Acido lipoteicoico de bacterias Gram positivas, Péptidoglicanos, ADN bacteriano, rico en nucleótidos no metilados CpGp, ARN doble hebra viral, ADN monohebra viral). Patrones moleculares que se expresan en órganos y células propias dañadas o alteradas y que constituyen una "señal de peligro" (**DAMPs por Damage Associated Molecular Patterns:** Ácido úrico, Proteínas de estrés, Proteínas del grupo "HMGB1" (high-mobility group box 1 proteins), ADN y ARN, cromatina y nucleosomas, proteasas e hidrolasas, galectinas y tioredoxina, ATP. Radicales Libres del Oxígeno) y, finalmente, patrones moleculares que se expresan en células envejecidas o en apoptosis (**ACAMPs por Apoptosis Cell Associated Molecular Patterns:** fosfatidil serina, ácidos nucleicos, hidratos de carbono y la forma oxidada de lipoproteínas de baja densidad. En términos más generales, los patrones moleculares propios de los agentes microbianos se designan como **MAMPs** (Microbial Associated Molecular Patterns), que incluyen moléculas expresadas por agentes microbianos no patógenos, particularmente aquellos que forman parte de la flora comensal o saprófita, conocida como microbiota.

b) Población linfocitaria. Este grupo celular incluye linfocitos T y Linfocitos B, que no son células efectoras pero que, luego del reconocimiento de epítopos antigénicos, adquieren una capacidad efectora de eliminación de aquello que debe ser destruido (Respuesta Inmune Inducible o Adquirida). Los linfocitos están provistos de TcR (T cell receptor) o BcR (B cell receptor) que reconocen ligandos específicos (llamados antígenos), distintos de los patrones moleculares reconocidos por las células de la respuesta innata.

La especificidad de la respuesta inmune, reside en los linfocitos T y linfocitos B y la eliminación antigénica puede hacerse directamente, mediante una respuesta celular citotóxica (**Respuesta celular**) o de manera indirecta a través de la síntesis de anticuerpos específicos (**Respuesta humoral**), que reclutan y activan mecanismos accesorios de eliminación (fagocitosis, citotoxicidad, activación del Sistema del Complemento)

Las células de la inmunidad innata, además de su función efectora, cumplen un importante rol accesorio o complementario, para el desarrollo de la inmunidad adquirida (Figura 10.1), puesto que están involucradas en: (i) el procesamiento y presentación de antígenos, (ii) proporcionar señales accesorias de co-estimulación a linfocitos T y linfocitos B antígeno-específicos, para su activación, proliferación y diferenciación (en células efectoras o en linfocitos de memoria) y (iii) la expresión de moléculas de adhesión o de "homing" (que determinarán su capacidad de recirculación o tráfico celular y de ingreso a distintos órganos o tejidos específicos, durante el desarrollo de la respuesta inmune).

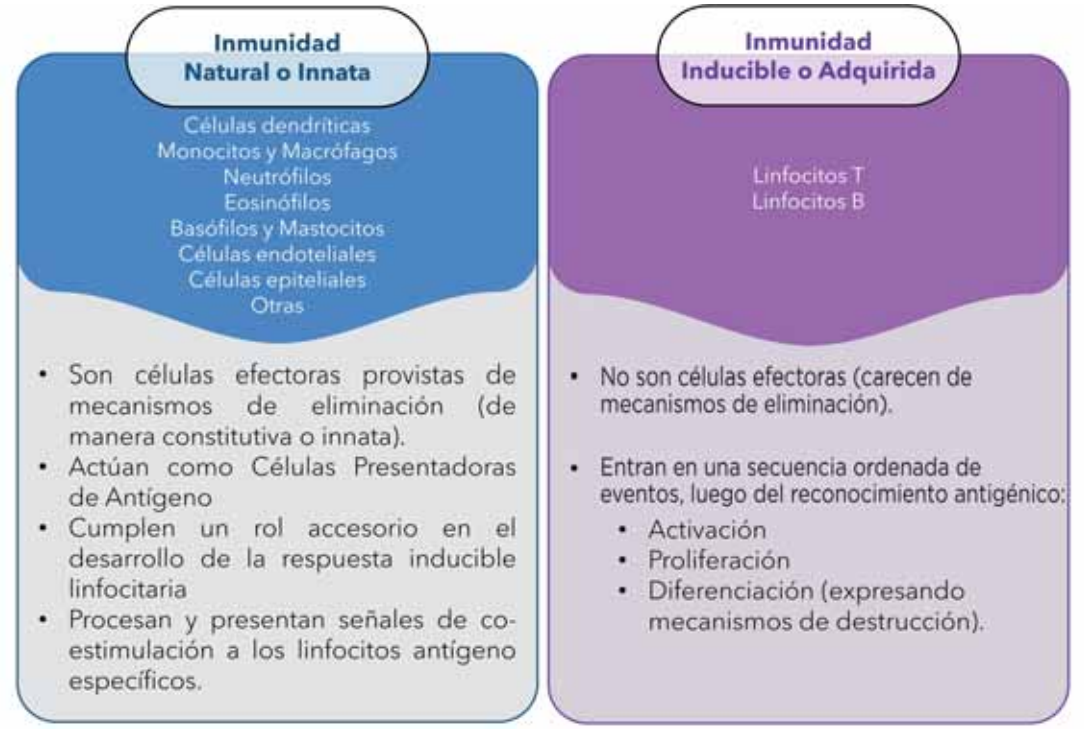

Inmunidad
Natural o Innata
Células dendríticas
Monocitos y Macrófagos
Neutrófilos
Eosinófilos
Basófilos y Mastocitos
Células endoteliales
Células epiteliales
Otras
• Son células efectoras provistas de mecanismos de eliminación (de manera constitutiva o innata).
• Actúan como Células Presentadoras de Antígeno
• Cumplen un rol accesorio en el desarrollo de la respuesta inducible linfocitaria
• Procesan y presentan señales de co-estimulación a los linfocitos antígeno específicos.
Inmunidad
Inducible o Adquirida
Linfocitos T
Linfocitos B
• No son células efectoras (carecen de mecanismos de eliminación).
• Entran en una secuencia ordenada de eventos, luego del reconocimiento antigénico:
• Activación
• Proliferación
• Diferenciación (expresando mecanismos de destrucción).

Figura 10-1. Inmunidad Innata e Inmunidad Adquirida en el desarrollo de la respuesta inmune.

Funcionalmente el Sistema Inmune en condiciones normales presenta inmunidad y autotolerancia y en condiciones patológicas autoinmunidad y tolerancia a lo extraño.

2. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LINFOCITOS

Los linfocitos constituyen una población heterogénea de células sanguíneas, que pueden distinguirse de otros leucocitos no solo por sus características morfológicas, sino también por sus características estructurales y funcionales.

En un frotis sanguíneo convencional los linfocitos presentan un tamaño de 6 a 10 µm, diferencias en la relación núcleo (N) y citoplasma © y la presencia o ausencia de gránulos citoplasmáticos azurófilos. *En una tinción hematológica con Giemsa pueden distinguirse dos tipos de linfocitos.* Los linfocitos pequeños carecen de gránulos azurófilos citoplasmáticos y presentan una elevada relación núcleo/citoplasma. En cambio, los linfocitos granulosos grandes presentan gránulos azurófilos y una baja relación núcleo citoplasma (Figura 10.2).

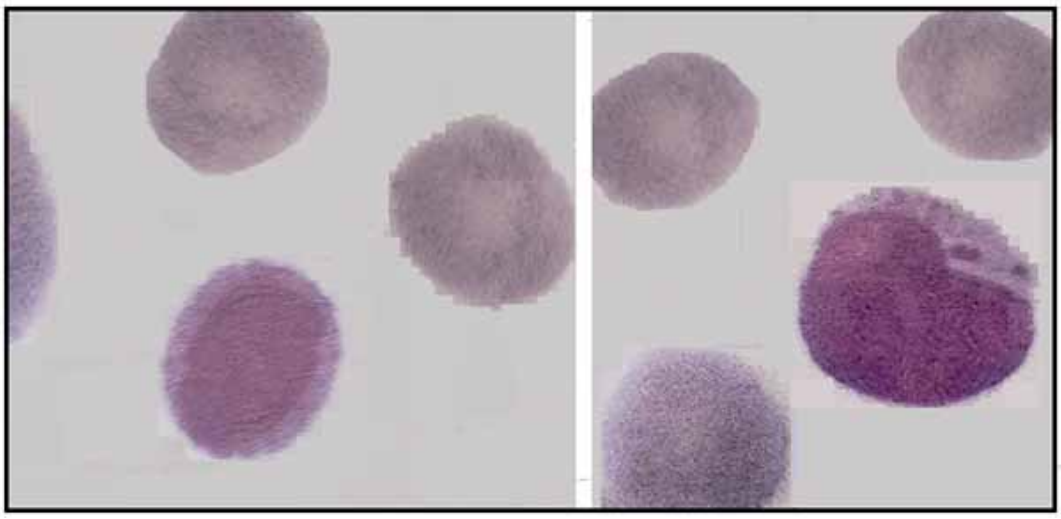


Figura 10-2. Heterogeneidad morfológica de los linfocitos. Los linfocitos pequeños (izquierda) carecen de gránulos azurófilos citoplasmáticos y presentan una elevada relación núcleo/ctitoplasma. En cambio los linfocitos granulares grandes (derecha) presentan gránulos azurófilos y una menor relación núcleo/citoplasma.

Los linfocitos constituyen una población heterogénea de células sanguíneas, que pueden distinguirse de otros leucocitos no solo por sus características morfológicas, sino también por sus características estructurales y funcionales.

De esta manera, los linfocitos pueden separarse en tres subpoblaciones estructural y funcionalmente distintas: linfocitos B, linfocitos T y los recientemente descritos linfocitos de la inmunidad innata o ILC por "Innate Lymphocyte Cells". Los linfocitos B y los linfocitos T se generan en los llamados órganos linfoides primarios en los que, luego en un proceso de recombinación génica y de diferenciación antígeno independiente, adquirirán la capacidad de expresar múltiples copias de un receptor epítopo antigénico específico, de modo tal que, mientras los linfocitos T se generan en el Timo, los linfocitos B tienen su origen en la médula ósea (Figura 10-3). Desde allí los linfocitos maduros ingresan al torrente sanguíneo para recircular entre los órganos linfoides secundarios (bazo, linfonodos y tejido linfoide asociado a mucosas y glándulas secretoras), en los que se producirá el encuentro con antígenos específicos y el desarrollo de una

respuesta inmune humoral y una respuesta celular, como consecuencia de una serie ordenada de eventos de activación, proliferación y diferenciación antígeno dependientes, que les convierten en linfocitos efectores y linfocitos de memoria.

La excepción está dada por los linfocitos ILC, residentes en órganos linfoides, mucosas y órganos y tejidos periféricos, que se caracterizan por la ausencia de receptores que reconocen antígenos, pero que se activan a través de receptores de alta afinidad que reconocen citoquinas específicas, secretadas por distintas células inmunocompetentes.

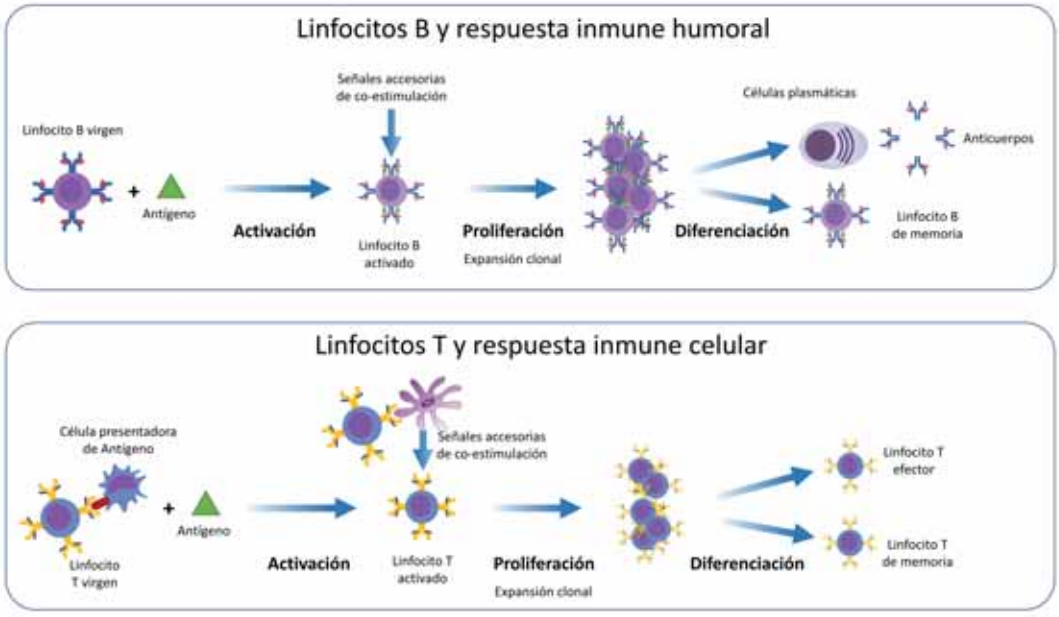


Figura 10-3. Esquema general de la serie ordenada de eventos de activación, proliferación y diferenciación que conducen al desarrollo de una respuesta inmune. (a) humoral, dependiente de linfocitos B y (b) celular dependiente de linfocitos T.

El desarrollo temprano de linfocitos B y de linfocitos de la inmunidad innata (ILC), así como sus primera etapas de diferenciación, ocurre en el hígado fetal en la época prenatal, para luego transferirse a la médula ósea durante el resto de la vida de los individuos. Los linfocitos B constituyen el centro de la respuesta inmune humoral puesto que su diferenciación en los órganos linfoides secundarios dará origen a células plasmáticas que, como células efectoras de esta respuesta humoral, son responsables de la síntesis y secreción de anticuerpos específicos, que representan la versión soluble y bifuncional, de la inmunoglobulina de superficie y mono funcional presente en la membrana plasmática del linfocito B originalmente activado por antígenos específicos. Los anticuerpos son inmunoglobulinas solubles y bifuncionales puesto que, mientras los paratopos de su extremo amino terminal permiten el reconocimiento específico de epítopos antigénicos, la región Fc de su extremo carboxi-terminal recluta y activa distintos mecanismos de destrucción, entre los que se encuentran la fagocitosis,

la lisis osmótica mediada por el Sistema del Complemento y la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC por "Antibody Dependent Cell Citotoxicity"), asociada generalmente a células Natural Killer. La inmunoglobulina de superficie de los linfocitos B, presenta en su extremo carboxiterminal, una región hidrofóbica que determina su anclaje obligado a la membrana, convirtiéndola en una molécula mono funcional que solo tiene la capacidad de reconocer epítopos antigénicos a través de los paratopos, libres en su extremo amino terminal (figura 10-4).

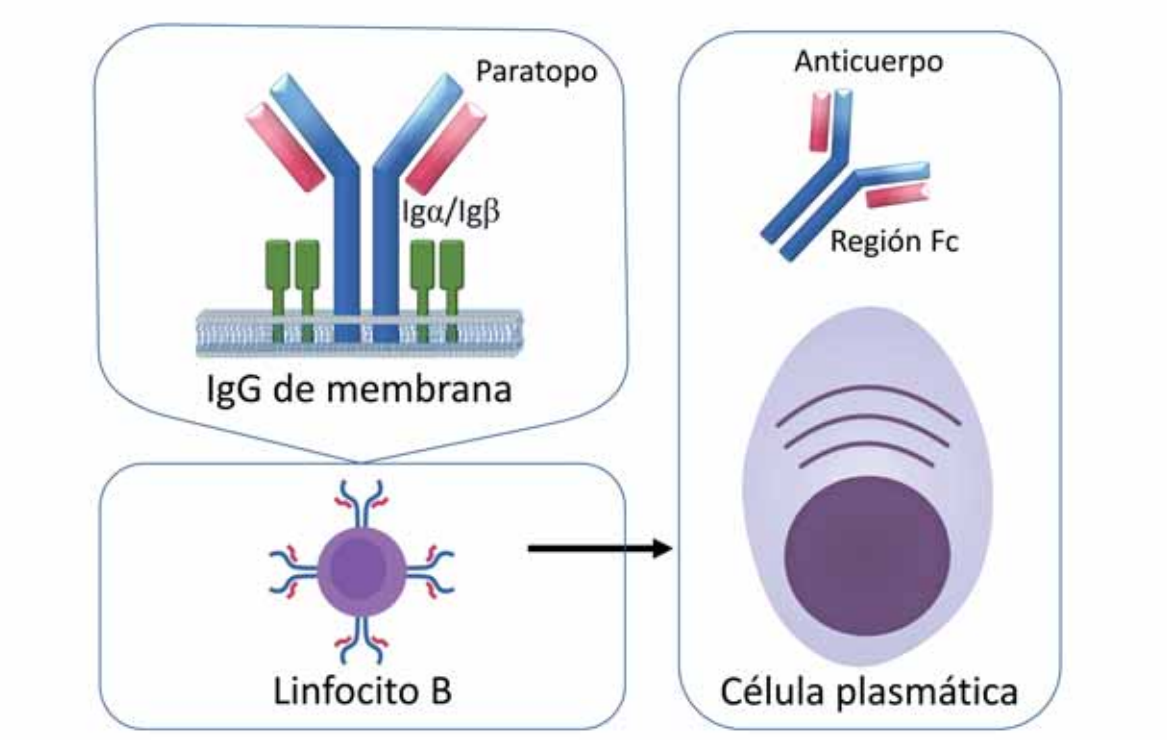


Figura 10-4. Linfocito B e Inmunoglobulina de membrana y célula plasmática e Inmunoglobulina soluble. La Innunoglobulina de membrana es monofuncional (solo reconoce epítopos antigénicos) y Inmunoglobulina soluble bifuncional (reconoce epítopos antigénicos por su extremo amino y recluta mecanismos de destrucción por su región Fc, ubicada en su extremo carboxilo). En la figura de la izquierda se muestra además el complejo accesorio, (Igα/Igβ) que forma parte del BcR y es responsable del transporte y expresión del receptor en la membrana, de la transducción de señales de activación cuando los paratopos unen epítopos específicos.

En los linfocitos B, el ensamblaje intracelular de cadenas pesadas y livianas para la formación de monómeros de Ig y su transporte y expresión en la membrana celular requiere la participación de un heterodímero o complejo accesorio Igα/Igβ (también denominado (CD79a/CD79b), que no solo formará parte estructural del "B cell Receptor", sino que será además funcionalmente responsable de la transducción de señales de activación cuando los paratopos de la Ig reconocen epítopos específicos.

3. LINFOCITOS B

3.1. Desarrollo de linfocitos B

Las inmunoglobulinas están constituidas por cuatro cadenas polipeptídicas dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas livianas también idénticas. Cadenas pesada y livianas se asocian mediante puentes disulfuro formando una estructura simétrica compuesta por dos heterodímeros pesado/liviano idénticos y covalentemente unidos entre sí por puentes disulfuro, ubicados inmediatamente por detrás de una "región bisagra", de gran movilidad.

En los linfocitos B, el ensamblaje intracelular de cadenas pesadas y livianas para la formación de monómeros de Ig y su transporte y expresión en la membrana celular requiere la participación de un heterodímero o complejo accesorio Igα/Igβ (también denominado (CD79a/CD79b), que no solo formará parte estructural del "B cell Receptor", sino que será además funcionalmente responsable de la transducción de señales de activación cuando los paratopos de la Ig reconocen epítopos específicos.

En la región aminoterminal de cada heterodímero existe un paratopo o sitio de combinación epítopo específico y formado por el dominio aminoterminal de cadenas pesadas y livianas. De esta manera un monómero de inmunoglobulina es una molécula bivalente, con dos sitios de combinación idénticos para el reconocimiento antigénico.

En el genoma de linfocitos B se encuentran los genes que codifican las cadenas pesadas y livianas de inmunoglobulinas pero, sorprendentemente, ellos no existen en el genoma o ADN germinal de la célula madre o célula progenitora que da origen a estos linfocitos.

La generación de linfocitos B a partir de una célula progenitora (en la médula ósea en mamíferos, o en la Bolsa de Fabricio en las aves), implica un proceso de diferenciación antígeno independiente en el que se producirá un reordenamiento génico al azar, pero ordenado de tres familias distintas de pequeños segmentos génicos denominados segmentos génicos variables (VH), segmentos génicos de Diversidad (DH) y segmentos génicos JH (por "Joining"), que se encuentran en una región particular del cromosoma 14 humano y codifican la región o dominio Variable aminoterminal de la cadena pesada (H), de la inmunoglobulina. A esta recombinación de segmentos génicos que codifican la cadena pesada, le seguirá el reordenamiento de pequeños segmentos génicos Vκ y Jκ del cromosoma 2 humano y que codifican la región variable de la cadena Liviana de isotipo kappa. En su defecto, la región variable de la cadena Liviana puede generarse recombinando segmentos génicos Vλ y Jλ, ubicados en el cromosoma 22 humano (Figura 10-5).

De esta manera entonces, la generación de linfocitos B se inicia con la recombinación del gen para la cadena pesada y, luego de la transcripción y traducción

del gen H, las cadenas pesadas se unirán covalentemente a una cadena Liviana sustituta, V pre B λ5, (puesto que aún no ha ocurrido el reordenamiento génico que permitirá generar el gen L),) y se ensamblarán con el complejo accesorio Igα/Igβ, para expresarse finalmente como un pre-BcR, en la membrana de la célula en diferenciación (célula preB).

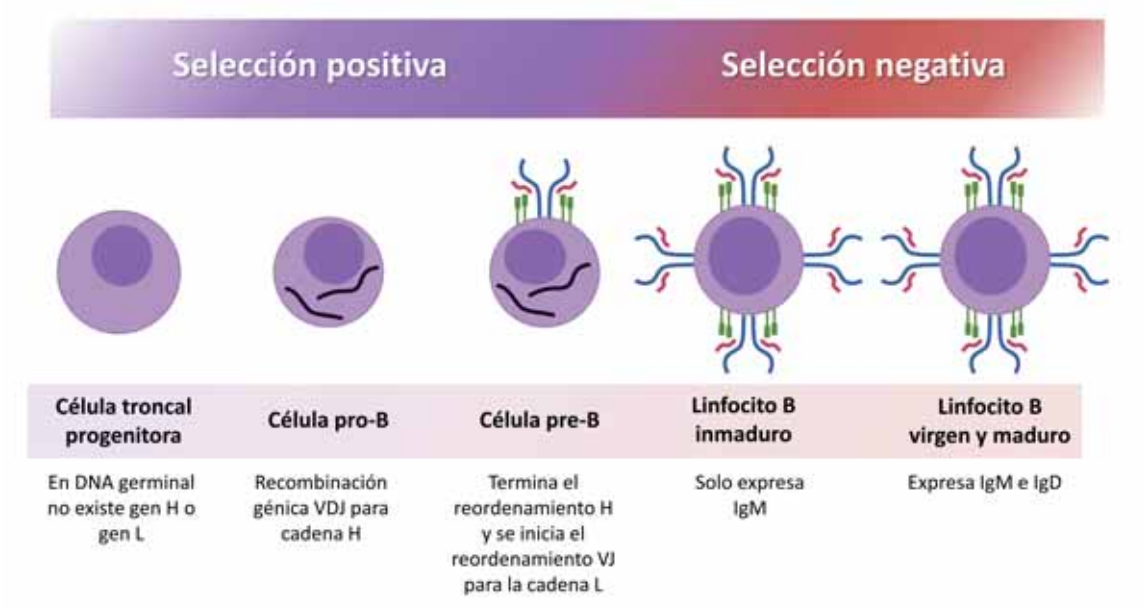

Selección positiva
Selección negativa
Célula troncal progenitora
Célula pro-B
Célula pre-B
Linfocito B inmaduro
Linfocito B virgen y maduro
En DNA germinal no existe gen H o gen L
Recombinación génica VDJ para cadena H
Termina el reordenamiento H y se inicia el reordenamiento VJ para la cadena L
Solo expresa IgM
Expresa IgM e IgD

Figura 10-5. Esquema de diferenciación antígeno independiente, de linfocitos T en la médula ósea de mamíferos.

La expresión de este complejo en la membrana, inducirá la detención de todo reordenamiento génico para la cadena pesada H y activará la recombinación de los segmentos génicos de la cadena Liviana. Luego de la recombinación de los segmentos génicos para la cadena liviana y de la transcripción y traducción, tanto del gen para la cadena pesada, como del gen para la cadena liviana, las moléculas de proteína se ensamblarán finalmente con el complejo accesorio Igα/Igβ, para expresarse como un BcR funcional completo de tipo IgM, en la membrana del linfocito B inmaduro, que en su etapa final de diferenciación expresará simultáneamente tanto BcR que contienen IgM como receptores que contienen IgD, convirtiéndose en un linfocito B virgen y maduro, que podrá incorporarse al repertorio linfocitario periférico (figura 10-6).

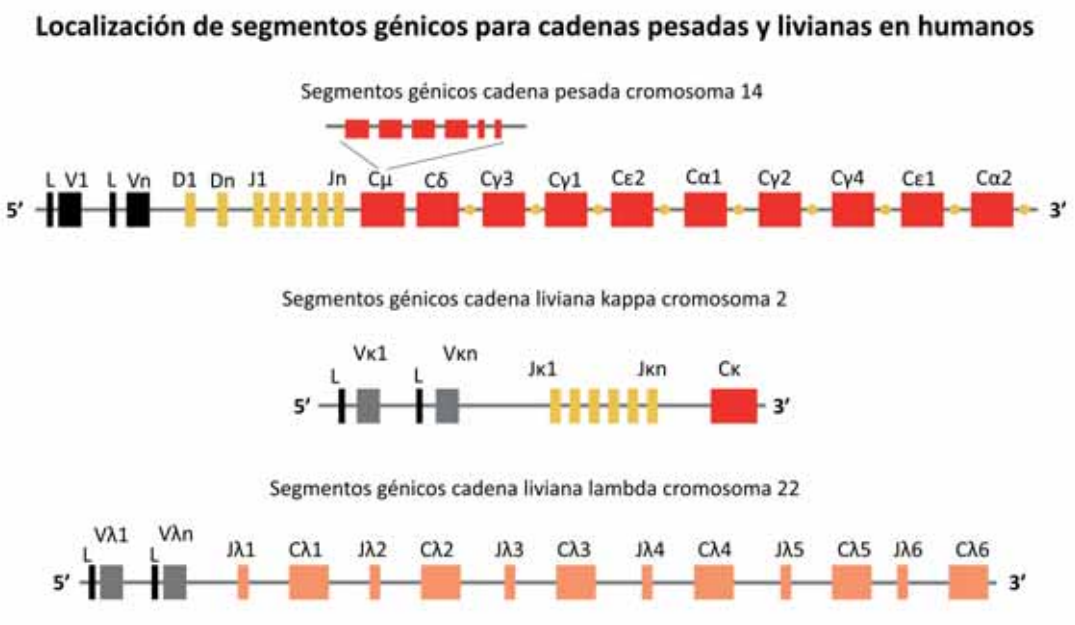

Localización de segmentos génicos para cadenas pesadas y livianas en humanos
Segmentos génicos cadena pesada cromosoma 14
L V1 L Vn D1 Dn J1 Jn Cμ Cδ Cγ3 Cγ1 Cε2 Cα1 Cγ2 Cγ4 Cε1 Cα2
5′
3′
Segmentos génicos cadena liviana kappa cromosoma 2
Vκ1 Vκn Jκ1 Jκn Cκ
L L
5′
3′
Segmentos génicos cadena liviana lambda cromosoma 22
Vλ1 Vλn Jλ1 Cλ1 Jλ2 Cλ2 Jλ3 Cλ3 Jλ4 Cλ4 Jλ5 Cλ5 Jλ6 Cλ6
L L
5′
3′

Figura 10-6. Organización de las distintas fámilias de segmentos génicos para cadenas pesadas y livianas. Pesadas (minigenes VH, DH, JH y CH en el cromosoma 14) y Livianas (isotipo kappa en el cromosoma 2 e isotipo lambda en el cromosoma 22 humano)

3.2. Linfocitos B y respuesta inmune humoral

En los últimos años ha habido considerable progreso en la comprensión de los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la enorme diversificación del repertorio linfocitario, en la generación de los distintos tipos de linfocitos de memoria y de anticuerpos, de sus distintas funciones efectoras, de sus diferentes afinidades por los epitopos antigénicos y de su rol en el desarrollo de inmunidad y autoinmunidad.

El tamaño y diversidad del repertorio linfocitario, aumenta la probabilidad que el sistema inmune reconozca un determinado antígeno, desencadenando la activación y proliferación o expansión clonal de los linfocitos-antígeno-específicos que solo después de proliferar se diferenciarán en linfocitos efectores, de manera que la respuesta linfocitaria será siempre clonal.

Las cadenas livianas de Inmunoglobulinas están constituidas por 220 aminoácidos separados en dos regiones o dominios estructural y funcionalmente distintos: un dominio Variable (V_L) aminoterminal de 110 aminoácidos y un dominio Constante (C_L) carboxiterminal, que también contiene 110 aminoácidos. De manera similar, en el extremo amino de la cadena pesada, también se ha descrito un dominio Variable (V_H) aminoterminal de 110 aminoàcidos y un dominio Constante (C_H) de mayor tamaño que contendrà 440 o 330 aminoàcidos, según el isotipo o clase de cadena pesada (Figura 10-7).

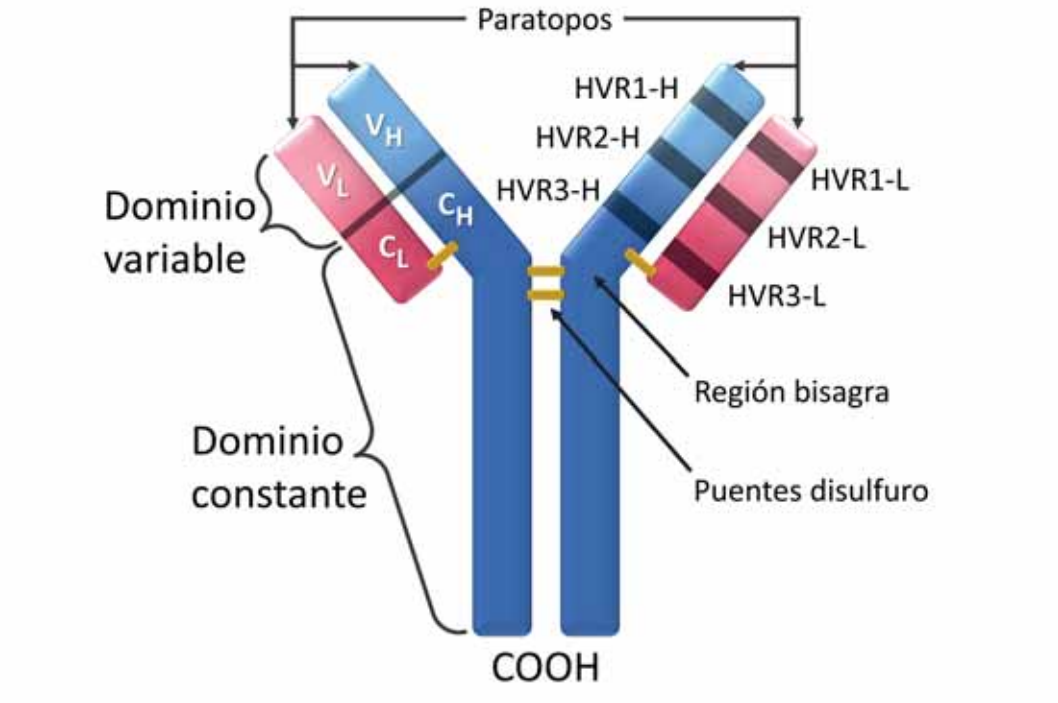


Figura 10-7. Esquema estructural de una molècula de inmunoglobulina.

La comparación de las secuencias aminoacídicas de distintas cadenas livianas ha permitido establecer que el dominio VL contiene tres pequeñas regiones- de inmunoglobulinas, permite establecer que en la región o dominio variable existen tres pequeñas regiones hipervariables (**"HVR: HyperVariable Regions"**), de 10 aminoácidos, también conocidas como CDR (por **"Complemmentary Determining Region"**), puesto que forman parte del paratopo y son complementarias de grupos químicos o regiones específicas del epitopo antigénico que será reconocido por ese paratopo). Estas pequeñas regiones hipervariables se designan (en dirección amino-carboxilo), como **HVR1** (o **CDR1** situada entre los aminoácidos 25-35), **HVR2** (o **CDR2** entre los aminoácidos 50-60) y **HVR3** o **CDR3** entre los aminoácidos 90 y 100).

En la región o dominio variable de las cadenas pesadas, también existes 3 pequeñas regiones hipervariables ubicadas en posiciones similares a las de las cadenas livianas y, que también forman parte del paratopo.

Variaciones en la región constante de las cadenas pesadas, permiten distinguir 5 clases, tipos o isotipos de cadenas pesadas, denominadas μ y ε (que contienen 4 dominios CH, de 110 aminoácidos) y α, δ, γ (que contienen 3 dominios CH de 110 aminoácidos).

La clase de cadena pesada que forma parte de un anticuerpo, determina así la clase, tipo o isotipo del anticuerpo (en un mismo individuo).

De esta manera, en un individuo existirán: (i) Anticuerpos IgM, que contienen cadena pesada μ, (ii) Anticuerpos IgD, que contienen cadena pesada δ, (iii) Anticuerpos IgG, que contienen cadena pesada γ, ((iv) Anticuerpos IgA, que contienen cadena pasada α y (v) Anticuerpos IgE que contienen cadena pesada ε.

La IgM y la IgE tienen cadenas pesadas con 550 aminoácidos (110 en la región variable VH y 440 aminoácidos en la región constante CH, que se distribuyen en 4 dominios llamados CH1, CH2, CH3 y CH4, en dirección desde el extremo amino al extremo carboxilo). En cambio, IgG, IgA e IgD, contiene cadenas pesadas con 440 aminoácidos (110 en la región V_H y 330 en la región constante C_H) distribuidos en 3 dominios constantes: CH1, CH2 y CH3 en dirección amino a carboxilo).

Luego del reconocimiento de antígenos solubles o antígenos presentados en la membrana de células dendríticas foliculares, los linfocitos inician una serie ordenada de eventos de activación, proliferación y diferenciación para generar células plasmáticas secretoras de anticuerpos y linfocitos B de memoria. En los linfocitos de memoria ocurre un proceso de recombinación génica de los segmentos génicos que codifican la región constante de cadena pesada (switching isotípico y cambio de la función efectora del anticuerpo) y un aumento en la afinidad de los paratopos como consecuencia de un fenómeno de hipermutación de las regiones hipervariables o CDRs, de cadenas pesadas y livianas (figura 10-8).

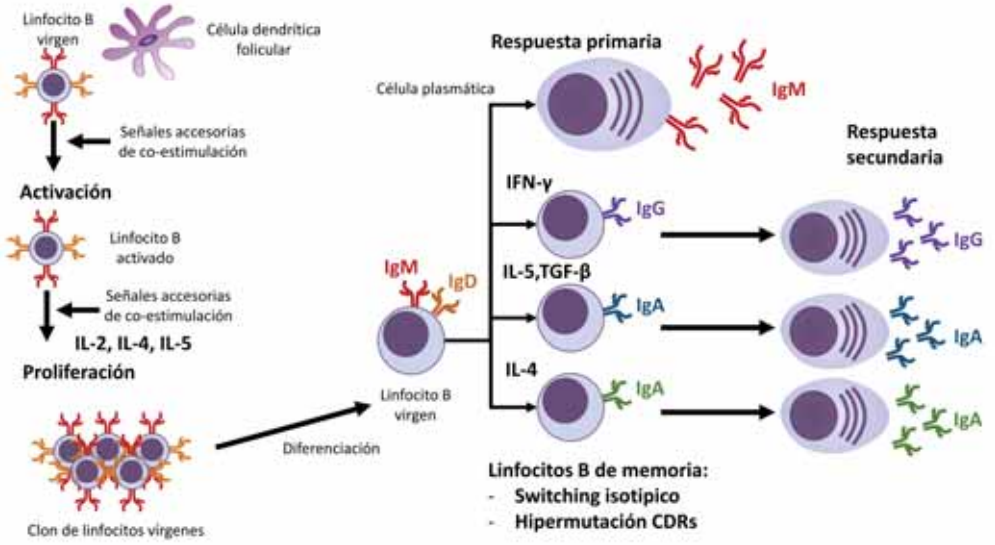


Figura 10-8. Linfocitos B y respuesta inmune en órganos linfoides secundarios.

Ahora bien, los linfocitos B vírgenes, contienen en su membrana monómeros de IgM e IgD, en forma de monómero de Ig (constituido por 2 cadenas livianas y 2 cadenas pesadas. Cuando, luego de su activación y proliferación, un linfocito B virgen (Bv) se diferencia en célula plasmática, esta sintetizará y secretará la misma IgM presente en la membrana del linfocito B que le da origen, pero en forma de Ig polimérica (anticuerpo polimérico en forma de pentámero o hexámero de

IgM)), que tendrá los mismos paratopos y por lo tanto especificidad por el mismo epitopo antigénico que la Ig de membrana del linfocito Bv.

En cambio, cuando un linfocito B virgen se diferencia en linfocito B de memoria, cambiará la región constante de la cadena pesada, reemplazando la cadena μ, por otro isotipo distinto, generando 4 tipos distintos de linfocitos B de memoria (Bm): los que tienen cadena pesada γ (IgG), los que tienen cadena pesada α (IgA), los que tienen cadena pesada ε (IgE) y otros que mantendrán la cadena pesada μ. En los linfocitos Bv o Bm, la Ig de membrana es siempre un monómero.

4. LINFOCITOS T

4.1. Receptor de linfocitos T (TcR)

El TcR), es un heterodímero glicoproteico transmembrana, que incluye dos subunidades estructural y funcionalmente distintas (y no covalentemente unidas entre sí).

La primera subunidad es el denominado receptor clonotípico formado por dos cadenas polipeptídicas alfa y beta o gamma y delta. (en linfocitos Tαβ o Tγδ, respectivamente), unidas por puentes disulfuro y cuyo extremos aminoterminales permite el reconocimiento específico del antígeno (Figura 10-9). La segunda subunidad corresponde al complejo accesorio CD3, responsable del transporte y expresión del TcR en la membrana y de la transducción de señales de activación, cuando el TcR se ha unido a un fragmento antigénico, en el contexto de una molécula presentadora de antígeno, en la membrana de una célula presentadora de antígenos.

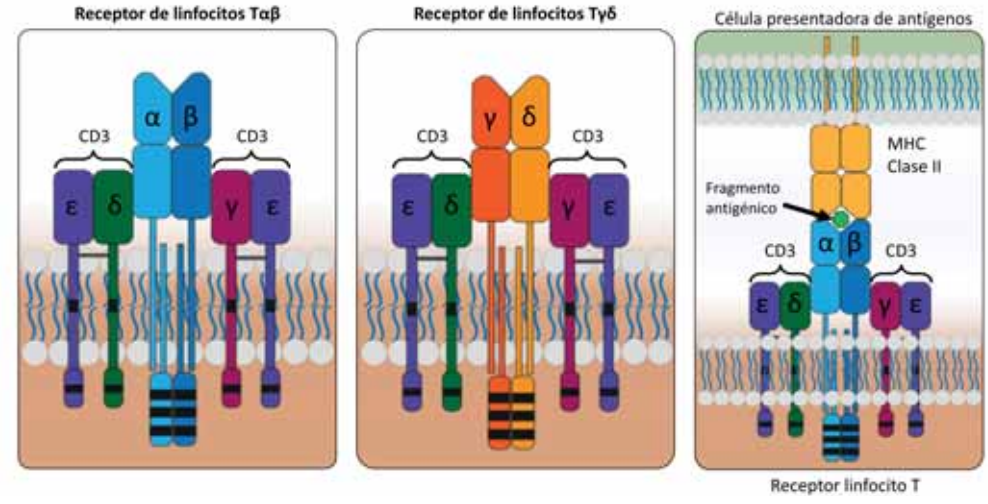


Figura 10-9. Estructura del receptor de linfocitos Tαβ y Tγδ. Ocupando una posición central se encuentra el heterodímero alfa/beta o bien gamma/delta que constituye la subunidad conocida receptor clonotípico, responsable del reconocimiento específico de un fragmento antigénico unido a una molécula presentadora de antígenos, en la membrana de una célula presentadora. La estructura del TcR incluye, además, un complejo accesorio CD3 responsable del transporte y expresión del TcR en la membrana y de la transducción de señales de activación luego del reconocimiento específico del complejo antígeno/molécula presentadora.

El receptor clonotípico es un heterodímero Tαβ o Tγδ, que reconoce fundamentalmente fragmentos peptídicos asociados a una molécula de presentación antigénica (moléculas MHC de clase I o MHC de clase II), antígenos glicolipídicos asociados a moléculas CD1 o bien reconocen intermediarios metabólicos de Riboflavina o Acido Fólico unidos a moléculas presentación MR1 (Moléculas MHC-I Related o MHC-I like).

Mientras el repertorio linfocitario B puede reconocer tanto antígenos solubles como de membrana, de naturaleza proteica, hidrocarbonada, lipídica, nucleotídica etc., el repertorio linfocitario T reconoce fundamentalmente fragmentos peptídicos asociados a molécula MHC de clase I o MHC de clase II, en la membrana de células presentadoras de Ag (CPA).

En el repertorio linfocitario B (de 10^{14} linfocito B distintos), se distinguen dos subpoblaciones celulares distintas (denominadas B1 y B2) que presentan características estructurales y funcionales distintas y que se generan a edades distintas durante la ontogenia linfocitaria. Los linfocitos B1 son los responsables de la generación de los anticuerpos naturales, que se producen en ausencia de estímulos antigénico conocido y específico y, por ello, se les considera parte de la inmunidad innata.

En el repertorio linfocitario T (10^{18} linfocitos T), se distinguen también dos subpoblaciones linfocitarias (denominadas Tαβ y Tγδ), que presentan receptores TcR estructural y funcionalmente distintos. Entre los linfocitos Tαβ se distinguen además, 3 subpoblaciones celulares distintas denominadas: TCD4+, TCD8+ y NKT; existen además linfocitos TCD4+/TCD8+ (DP =doble positivos) y linfocitos DN (doble negativos, no expresan CD4 y tampoco expresan CD8).

Los linfocitos NKT corresponden a linfocitos Tαβ que presentan moléculas o marcadores propios de células NK (como por ejemplo, la molécula NK1.1 o CD161.

El 90 a 95% de los linfocitos T corresponden a linfocitos Tαβ, que reconocen fundamentalmente fragmentos peptídicos unidos a una molécula de presentación MHC, en la membrana de una célula presentadora de antígeno.

El 5 a 10% restante, corresponden a linfocitos Tγδ entre los cuales se pueden distinguir linfocitos que reconocen fragmentos peptídicos unidos a moléculas MHC linfocitos Tαβ que reconocen glicolípidos unidos a moléculas CD1 y, finalmente, linfocito Tγδ que como los linfocitos B, pueden reconocer directamente diversas moléculas (particularmente compuestos fosforilados).

Los linfocitos Tγδ se encuentran fundamentalmente en piel y mucosas (linfocitos intraepiteliales, que forman parte de la inmunidad innata) y se generan antes que los linfocitos Tγδ, durante la ontogenia o diferenciación linfocitaria en el timo.

4.2. Subpoblaciones de linfocitos T

Entre los linfocitos Tαβ se distinguen 4 grupos o subpoblaciones celulares (figura 10-10):

a) Linfocitos Tαβ CD8+, que reconocen fragmentos peptídicos unidos a moléculas MHC de clase I. La molécula CD8 actúa como co-receptor linfocitario, transduciendo una señal accesoria de coestimulación, al reconocer una región conservada de la molécula MHC de clase I.
b) Linfocitos Tαβ CD4+, que reconocen antígenos peptídicos unidos a moléculas MHC de clase II. La molécula CD4 actúa como co-receptor linfocitario, transduciendo una señal accesoria de coestimulación, al reconocer una región conservada de la molécula MHC de clase II.
c) Linfocitos NKT, que reconocen antígenos lipídicos unidos a moléculas de presentación llamadas CD1.
d) Linfocitos MAIT (Mucosal Associated Invariant T cell) que residen en hígado y en el intestino y reconocen intermediarios metabólicos de Riboflavina o Ácido Fólico unidos a moléculas presentación MR1 (Moléculas "MHC-I Related" o "MHC-I like").

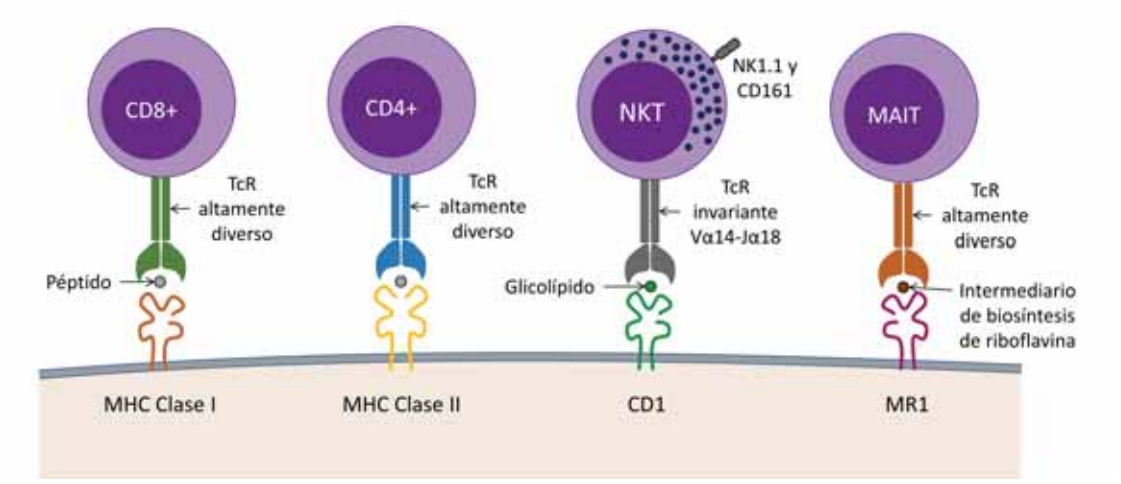


Figura 10-10. Esquema del TcR de subpoblaciones linfocitarias Tαβ y sus respectivas moléculas presentadoras de antígeno, en la membrana de células presentadoras.

Ahora bien, los distintos linfocitos T sintetizan y secretan un grupo particular de citoquinas que les confieren la capacidad de: activar distintas poblaciones celulares (función "helper", de colaboración o ayuda); inhibir o suprimir subpoblaciones celulares (función supresora o reguladora) y destruir o eliminar un grupo particular de células (función citotóxica). Sin embargo, aun cuando todos los linfocitos T efectores realizan estas tres funciones, ellos se clasifican en subpoblaciones distintas, en conformidad a la función que realizan con mayor eficiencia. De esta manera se distinguen linfocitos Th (T helper, de colaboración

o ayuda), linfocitos Treg (T reguladores o T supresores) y linfocitos Tc (T citotóxicos) (Figura 10-11).

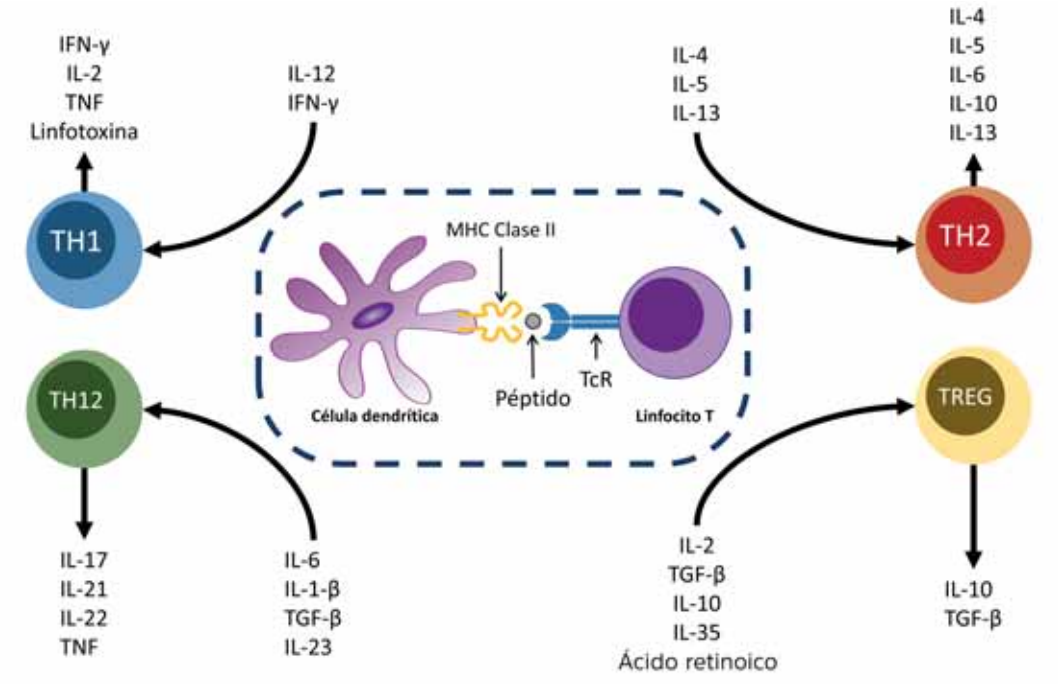


Figura 10-11. Diferenciación de subpoblaciones celulares T helper, en presencia de distintas citoquinas. a) En presencia de IL-12 e IFN-γ, se generan linfocitos Th1 que secretan IL-2, IFN-γ, TNF y Linfotoxina. b) Las citoquinas IL-4, IL-6, e IL-13 inducen la diferenciación de la subpoblación Th2, que secreta IL-4, Il-5, IL-6, IL-10 e IL-13. c) La presencia de IL-1,β, IL-6, IL-23 y de TGF-β, activa la diferenciación de linfocitos Th17, que secretan IL-17, IL-21 e IL-22. d) Finalmente, en presencia de TFG-β, Il-2, IL-10, IL-35 y ácido retinoico, se induce la diferenciación de linfocitos T reguladores, que secretan IL-10 y TGFβ (Transforming Growth Factor Beta).

La figura 10-12 esquematiza las citoquinas características de Linfocitos T helper y sus homólogos de la inmunidad innata (ILC: Innate Lymphoid Cells).

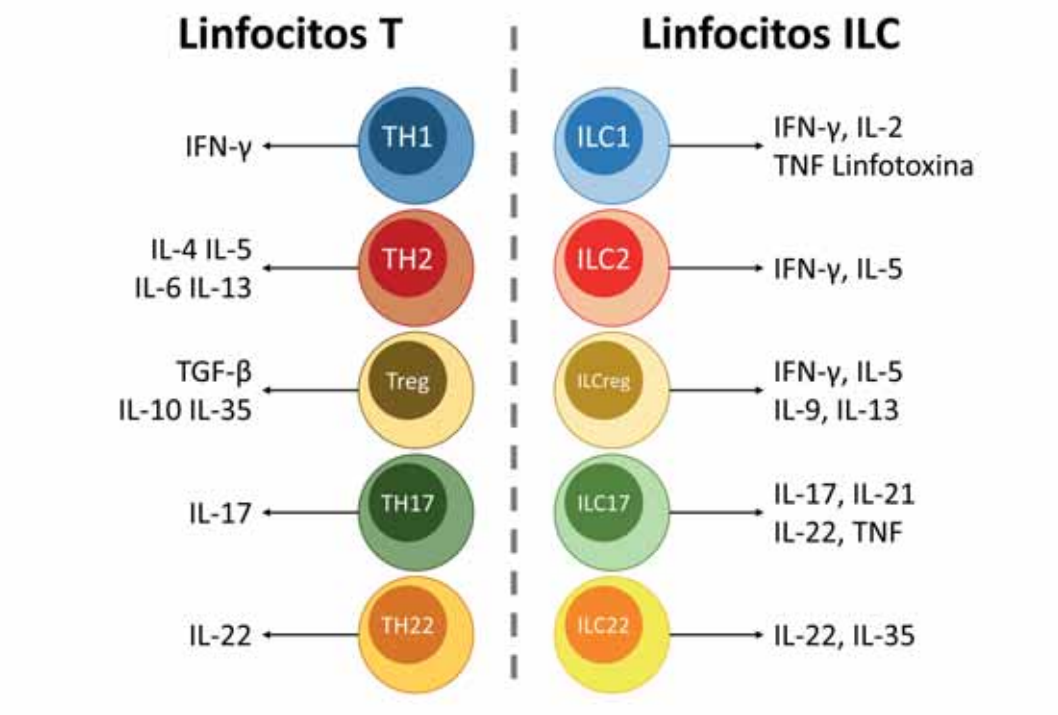


Figura 10-12. Linfocitos T helper y sus homólogos ILC, de la inmunidad innata ("ILC: Innate Lymphoid Cells)

5. CÉLULAS LINFOIDES DE LA INMUNIDAD INNATA

Las células linfoides de la inmunidad innata (ILC: "Innate lymphoid cells") constituyen una nueva subfamilia de linfocitos que se distingue de los linfocitos T y linfocitos B de la inmunidad adquirida, porque carecen de un receptor clonotípico que reconoce epitopos antigénicos y porque su desarrollo es independiente de la maquinaria de recombinación génica y de la expresión de los genes Rag1 y Rag2 (Rag: recombination activating gene).

Morfológicamente, las ILCs se parecen a linfocitos T y linfocitos B y se desarrollan a partir de un progenitor linfoide común (CLP: Common lymphoid progenitor), que expresa CD127 (también conocido como el receptor IL-7Rα).

Además, las célula ILC maduras expresan moléculas de superficie y moléculas efectoras de subpoblaciones de linfocitos T diferenciados y cuya expresión encuentra bajo el control de factores de transcripción específicos, lo que apoya su similitud con sus homólogos celulares de la inmunidad adquirida. Sin embargo, a diferencia de la respuesta linfocitaria que requiere de varios días o semanas para completar la diferenciación celular, las ILC son células efectoras tempranas de la respuesta inmune, y que responden en pocas horas, luego de su activación.

Las células linfoides ILC de la inmunidad innata (ILC: Innate Lymphoid Cells), constituyen, entonces, una nueva familia de células efectoras linfoides, que parecen constituir el homólogo innato, de linfocitos T efectores diferenciados.

Se han identificado, hasta ahora, 3 grupos de ILCs, llamadas ILC1, ILC2 e ILC3, sobre la base de la expresión de citoquinas y el requerimiento de factores de transcripción específicos, que resultan esenciales para su diferenciación y que, hasta ahora, se habían asociado al desarrollo de los linfocitos T helper (Th1, Th2 y Th17 respectivamente).

Las ILC1 producen citoquinas del tipo Th1 como IFN-γ y TNF e incluye a las células NK convencionales (cNK) y otras células productoras de IFN-γ.

Las células ILC2 producen citoquinas del tipo Th2 como IL-5, IL-9 e IL-13 e incluye células como los nuocitos, natural helper cells e innate helper 2 cells.

Las células ILC3 secretan citoquinas del tipo TH17, y comprende distintas subpoblaciones fenotípicas, incluyendo células LTi (lymphoid tissue inducer) y células que expresan el receptor NCR (natural cytotoxicity receptor) y producen citoquinas del tipo Th17 (como IL-17A e IL-22).

Existe una notable similitud entre los factores de transcripción específicos requeridos para el desarrollo y diversificación de distintos grupos de células ILC, y aquellos requeridos para la diferenciación de linfocitos T helper.

Las ILCs promueven la inmunidad innata contra diversos patógenos en el intestino.

(a) Las ILC1s promueven la inmunidad innata contra patógenos intracelulares como ***Toxoplasma gondii***, produciendo TNF e IFN-γ en respuesta a IL-12 producida por células dendríticas, promoviendo el subsecuente reclutamiento de células inflamatorias mieloides.

(b) En la infección con parásitos helmintos (***N. brasiliensis*** o ***T. muris***), las ILC2s producen IL-13 en respuesta a IL-25, IL-33 y TSLP, derivadas de células epiteliales, aumentando la contractibilidad de la musculatura lisa y la producción de mucus por las células caliciformes (“goblet cells”).

(c) Las ILC3s producen IL-17 e IL-22 en respuesta a IL-23 e IL-1β derivadas de células dendríticas y que promueven la inmunidad innata contra hongos y bacterias extracelulares como ***C. rodentium y C. albicans***. IL-17 e IL-22 promueven el reclutamiento de neutrófilos en el intestino y la producción de péptidos antimicrobianos por las ILCs.

Las ILCs son amplificadas en diversas enfermedades inflamatorias que afectan la función de la barreras epiteliales contribuyendo así al desarrollo de patología. En la dermatitis atópica aumenta el número de células ILC2s y las células ILC3

son amplificadas en las lesiones de los individuos con psoriasis y producen IL-22, que probablemente contribuye al desarrollo de acantosis o engrosamiento de la piel que caracteriza a esta enfermedad. Las células ILC que producen IL-17-pueden aumentar la inflamación de la piel y las ILCs que producen IFN-γ e IL-17 pueden contribuir al desarrollo de enfermedades inflamatorias intestinales en ratones. Finalmente células ILCs que producen IFN-γ se encuentran claramente amplificadas en el tejido intestinal inflamado de pacientes que sufren de la enfermedad de Crohn's. La tabla 10-1 muestra las citoquinas y factores de transcripción expresados por células ILC.

Tabla 10-1. Citoquinas y factores de transcripción expresados por células ILC

Estímulo por citoquinas	Diferenciación en subpoblación ILC	Expresión de Factores de transcripción	Citoquinas secretadas
IL-12, IL-15	ILC1 (como NK, controlan bacterias intracelulares)	T-bet	IFNy, IL-2, TNF, Linfotoxina
IL-12, IL-12, IL-15 e IL-18, IL-25, IL-33, TSLP (ThymicStromal Lymphopoietin)	Incluye ILC2, NK y helperlikeILC2. (son estimuladas por unión de receptor de activación NK2GD	GATA3, EOMES (eomesodermin) NK (T-bet)	INFy, IL-5, IL-9, IL-13 Anphiregulinis a growth factor). Responden a infecciones por helmintos activando macrófagos y eosinófilos e hiperplasia de células caliciformes
IL-1,β, IL-6, IL-23 y de TGF-β	ILC3	RORγt,	IL-17, IL-21, IL-22, TNF. Activan granulocitos y controlan bacterias extracelulares y hongos

ROR, Retinoic-acid-receptor related Orphan Receptor

6. MEMORIA INMUNOLÓGICA E INMUNIDAD DE ENTRENAMIENTO ("Trained Immunity")

La memoria inmunológica se ha definido tradicionalmente como una caracterìstica fundamental de la inmunidad adquirida.

Cuando linfocitos T o B se encuentran por primera vez con el antígeno, ellos se activan. proliferan y diferencian en células efectoras y células de memoria que conservan el mismo receptor linfocitario y responden de manera más rápida y con mayor intensidad frente a un segundo encuentro con el mismo antígeno (concepto de memoria inmunológica).

Sin embargo esta capacidad ha sido extendida a linfocitos de la inmunidad innata (células NK e ILC2), células epiteliales y células mieloides como monocitos y macrófagos activados por β glucanos que adquieren una mayor actividad fagocítica y alta producción de citoquinas, promoviendo protección contra ciertos patógenos.

En enfermedades respiratorias alérgicas, luego del encuentro con el alérgeno el epitelio pulmonar se daña y libera las alarminas IL-25 e IL-33 que activan células ILC2 que, además de proliferar y producir citoquinas de tipo Th2 y adquieren características similares los linfocitos de memoria, lo que ha conducido a proponer el concepto de "**inmunidad de entrenamiento**" (**"trained immunity"**) para describir esta respuesta más eficiente y más rápida "memory like" de la inmunidad innata y distinguirla de la memoria inmunológica propia de linfocitos T y linfocitos B.

7. LECTURAS SUGERIDAS

Biram A. Shulman, Z. 2020. T cell help to B cells: Cognate and atypical interactions in peripheral and intestinal lymphoid tissues. Immunol. Reviews.296: 36-47.

Bluestone, J. A, and Anderson, M. 2020. Tolerance in the Age of Immunotherapy. N Engl J Me d 383: 1156-1166.

Josefowicz, S. Z., Lu, Li Fan, Rudensky, A. Y. 2012. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. Annu Rev Immunol 30:531-564.

Bhaskaran, P. P., Zou M, Schneider E, Jayaraman S, Huehn J. 2019. Microbiome dependent regulation of Tregs and Th17 cells in mucosa. Front Immunol 10: 1-17.

Faigebaum, D. C. David C. and June, C. H.. 2019. Cytokine Storm N. Engl. J. Med, 383:225-227.

Hua, Z., Hou, B. 2020. The role of B cell antigen presentation in the initiation of CD4+ T cell response Immunol. 296:24–35.

Inoue T, Moran I, Shinnakasu R, Phan TG, Kurosaki T. 2018. Generation of memory B cells and their reactivation. Immunol Rev. 283:138-149.

Dhenni, R., Phan, T. G. 2020. The geography of memory B cell reactivation in vaccinei nduced immunity and in autoimmune disease relapses Immunol. Reviews. 296:62–86.

Weisel F, Shlomchik M. 2017. Memory B cells of mice and humans. Annu Rev Immunol. 35:255-284.

Cancro MP. 2020. Age-associated B cells. Annu Rev Immunol. 38: 315-340.

Shinnakasu R, Kurosaki T. 2017. Regulation of memory B and plasma cell differentiation. Curr Opin Immunol. 45:126-131.

Masopust D, Soerens AG. 2019. Tissue-resident T cells and other resident leukocytes. Annu Rev Immunol. 37:521-546.

Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM. 2015. The generation of antibody-secreting plasma cells. Nat Rev Immunol. 15:160-171.

Biram A, Davidzohn N, Shulman Z. 2019. T cell interactions with B cells during germinal center formation, a three-step model. Immunol Rev. 288:37-48.

Chen K, Magri G, Grasset EK, Cerutti A. 2020. Rethinking mucosal antibody responses: IgM, IgG and IgD join IgA. Nat Rev Immunol. 20: 427-441.

Wing, J. B., Lim, E. L., | Sakaguchi, S. 2020. Control of foreign Ag-specific Ab responses by Treg and Tfr. Immunological Reviews. 296:104–119.

Wing JB, Tanaka A, Sakaguchi S. 2019. Human FOXP3(+) Regulatory T cell heterogeneity and function in autoimmunity and cancer. Immunity. 50:302-316.

Frasca, D., Blomberg, B.B., Garcia, D. Keilich, S. R. Haynes, L. 2020. Age-related factors that affect B cell responses to vaccination in mice and humans. Immunological Reviews. 296:142–154.

Vivier E., Artis, d., Colonna, m., Diefenbach,A., Di Santo, J. P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R. M., McKenzie, A. N. J.,Mebius, R. E., Powrie, F., Spits, H. 2018. Innate Lymphoid Cells ten years ON Cell 164: 1054-1066.

Eberl, G., Colonna, M., [...], and Andrew N.J. McKenzie, A, N. J., 2015. Innate Lymphoid Cells: a new paradigm in immunology.Science 348: 6237.

Gérard Eberl1, Marco Colonna2, James P. Di Santo3, and Andrew N.J. McKenzie. 2015. Innate Lymphoid Cells: a new paradigm in immunology 348:6237-6279.

Déchanet-Merville, J., Prinz, I. 2020. From basic research to clinical application of γδ T cells. Immunol Reviews 298: 5-9.

Hartigan, C. R., Sun, H., Ford, M. L. 2019. Memory T-cell exhaustion and tolerance in transplantation. Immunol. Reviews 292: 225-242.

Fischer, M. A., Golovchenko, N. B., Edelblum, K., L. 2020. γδ T cell migration: Separating trafficking from surveillance behaviors at barrier surfaces. Immunol. Reviews 298: 165-180.

Burnett1, D. L., Reed, J., H., Christ, D., Goodnow, C. C. 2019. Clonal redemption and clonal anergy as mechanisms to balance B cell tolerance and immunity. Immunol. Reviews 292: 261-275.

Capítulo

11

EOSINÓFILOS Y BASÓFILOS

Sergio Wehinger W., Iván Palomo G., Eduardo Fuentes Q.

Resumen

1. Introducción

2. Eosinófilos
- 2.1. Origen en médula ósea
- 2.2. Contenido de los gránulos y secreción
- 2.3. Fenotipo de la superficie celular
- 2.4. Activación y migración de los esoinófilos
- 2.5. Función de los eosinófilos
  - 2.5.1. Infecciones parasitarias
  - 2.5.2. Infeciones fúngicas
  - 2.5.3. Infeciones virales
  - 2.5.4. Infecciones bacterianas
  - 2.5.5. Respuesta antitumoral
  - 2.5.6. Regulación del sistema inmunitario y hemostático.
- 2.6. Síndromes eosinofílicos
  - 2.6.1. Síndrome hipereosinofílico mieloide
  - 2.6.2. Síndrome hipereosinofílico linfocítico
  - 2.6.3. Síndrome hipereosinofílico de superposición
  - 2.6.4. Síndrome hipereosinofílico asociado
  - 2.6.5. Síndrome hipereosinofílico familiar
  - 2.6.6. Síndrome hipereosinofílico idiopático
- 2.7 Trastornos inmunológicos con eosinofilia

3. Basófilos
- 3.1. Origen en médula ósea
- 3.2. Contenido de los gránulos, activación y secreción
- 3.3. Fenotipo de la superficie celular
- 3.4. Función de los basófilos
  - 3.4.1. Regulación del sistema inmunitario
  - 3.4.2. Reacciones de hipersensibilidad
  - 3.4.3. Infecciones parasitarias
  - 3.4.4. Infecciones bacterianas y fúngicas
  - 3.4.5. Asociación con cáncer
- 3.5. Síndromes Basofílicos

4. Lecturas sugeridas

RESUMEN

Los eosinófilos y basófilos son los granulocitos circulantes más escasos y como leucocitos, son los menos comunes de la sangre, pero sus características morfológicas en una tinción de hematoxilina-eosina los hace muy particulares a la vista.

Los eosinófilos han sido históricamente asociados a la respuesta inmunitaria innata, con un rol benéfico en la protección frente a infecciones parasitarias, aunque la efectividad de esta función puede variar significativamente según el agente parasitario. No obstante, hay evidencia de que participan en varios otros procesos inmunes contra infecciones bacterianas, virales y fúngicas. También es conocida la implicancia de estas células en procesos fisiopatológicos con respuestas inmunitarias inadecuadas, como en hipersensibilidad y síndromes hipereosinofílicos. Esto se asocia a la capacidad de los eosinófilos para regular al sistema inmunitario y hemostático. Han habido grandes avances en la caracterización fenotípica-molecular de los receptores y las citoquinas asociadas a los eosinófilos, auque aún quedan muchos aspectos sobre su rol en el sistema inmunitario por estudiar.

Por su parte, los basófilos son los leucocitos circulantes más escasos y menos conocidos y hasta hace poco, se le consideraba un equivalente circulante de los mastocitos, en cuanto a su rol en las respuestas de hipersensibilidad. No obstante, esta visión ha cambiado, ya que los perfiles de expresión de los basófilos no son idénticos a los de los mastocitos y hoy se consideran más cercanos al linaje de los eosinófilos. A pesar de su escasez en sangre, los basófilos, cumplen un rol importante en las respuestas inmunitarias tipo Th2 tanto fisiológicas como fisiopatológicas y su aumento se da en numerosas patologías, aunque el significado de dichos aumentos no está del todo esclarecido en algunas de ellas.

1. INTRODUCCIÓN

Los eosinófilos y los basófilos fueron descritos por Paul Enhrich en 1879. Estas células son bastante menos estudiadas y conocidas en comparación con otros leucocitos, como los monocitos, neutrófilos y en especial, los linfocitos. Por ello, ambos tipos celulares permanecen hasta el día de hoy como los leucocitos circulantes más misteriosos y menos comprendidos. Históricamente se les ha asociado al sistema inmunitario innato, aunque se ha demostrado que también pueden ejercer su influencia en la respuesta inmunitaria adaptativa.

A los eosinófilos se les han descrito una gran cantidad de moléculas receptoras en la superficie de la membrana celular y, a parte de su clásica función anti parasítica, se les han atribuido nuevos roles en la regulación de la respuesta

inmunitaria, del sistema hemostático y de la respuesta inflamatoria. Además, participan en los mecanismos moleculares de varias enfermedades donde existe una respuesta inmunitaria inadecuada.

A los basófilos, por su parte, se les ha atribuido especial relevancia en los procesos de defensa contra los parásitos e inflamación alérgica, especialmente en procesos crónicos de esta última. Comparten algunos aspectos morfológicos y funcionales con los mastocitos, aunque a diferencia de estos, los basófilos circulan en el torrente sanguíneo en forma madura desde inicio, tienen una menor vida media y los perfiles de expresión entre ambas células no son los mismos, por lo que sus funciones serían más bien complementarias y no redundantes. Finalmente, uno de los aspectos más relevantes de los basófilos es su participación en distintos tipos de hipersensibilidad, lo que revela su importante rol en diversas patologías inflamatorias.

2. EOSINÓFILOS

Los eosinófilos, del griego eos (aurora) y *philos* (amigo, aficionado a), refieren su nombre por tender a teñirse marcadamente con la tinción ácida de eosina (del griego eos: aurora, dado el color rosado de esta tinción). Son células de un tamaño de entre 10 y 15 µm de diámetro, cuyo núcleo es generalmente bilobulado, con fuerte presencia de gránulos citoplasmáticos (figura 11-1). Son uno de los leucocitos sanguíneos más inconfundibles, pero menos frecuentes, con solo un 1-4% (0 a 500/µl de sangre) del total de los leucocitos circulantes. Esto se debe en gran parte a que el 99% de los eosinófilos se encuentran distribuidos en los tejidos, después de un breve paso de aproximadamente 30 minutos por la sangre, una vez salidos de la médula ósea. No obstante, su importancia en la evolución del sistema inmunitario es sugerida por el hecho de que están presentes en todos los vertebrados, desde peces a mamíferos.

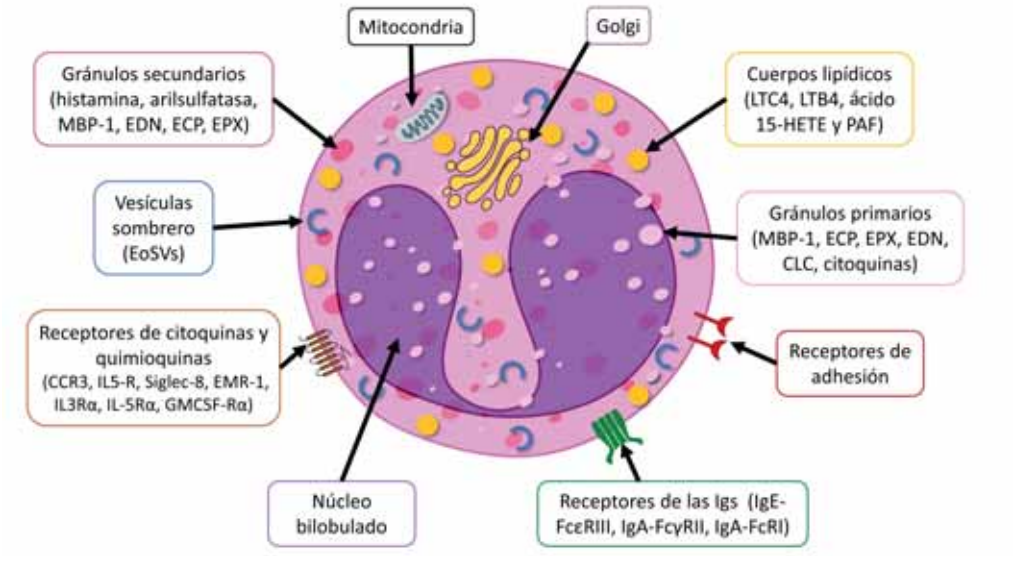

Mitocondria
Golgi
Gránulos secundarios (histamina, arilsulfatasa, MBP-1, EDN, ECP, EPX)
Cuerpos lipídicos (LTC4, LTB4, ácido 15-HETE y PAF)
Vesículas sombrero (EoSVs)
Gránulos primarios (MBP-1, ECP, EPX, EDN, CLC, citoquinas)
Receptores de citoquinas y quimioquinas (CCR3, IL5-R, Siglec-8, EMR-1, IL3Rα, IL-5Rα, GMCSF-Rα)
Receptores de adhesión
Núcleo bilobulado
Receptores de las Igs (IgE-FcεRIII, IgA-FcγRII, IgA-FcRI)

Figura 11-1. Estructura general y componentes más destacables de los eosinófilos.

2.1. Origen en médula ósea

Los eosinófilos, al igual que todas las células del linaje mieloide, se originan en médula ósea desde células madre multipotentes hematopoyéticas, las que dan origen a **progenitores eosinófilo-comprometidos**, los cuales son capaces de desarrollarse en eosinófilos maduros (figura 11-2), sin la necesidad de ningún factor de crecimiento o citoquina linaje-específica, ni siquiera de IL-5. Esta célula eosinófilo-comprometida expresa una serie de receptores, destacando la subunidad alfa del receptor de IL-5 (IL-5Rα). Este progenitor IL-5Rα$^+$ solo da origen a eosinófilos maduros y no a basófilos ni células mastocitos. Hoy en día, se ha determinado que la estimulación normal para la producción de eosinófilos es dependiente del factor de transcripción GATA-1, cuya expresión es regulada a su vez, por un enhancer (secuencia potenciadora de la transcripción) específico del linaje eosinofílico, ubicado en el mismo gen *GATA-1*. Aparte de la expresión de GATA-1, otros factores de transcripción juegan un papel importante en la orquestación transcripcional que da lugar a la generación del linaje eosinofílico, tales como la expresión de PU.1, la disminución de FOG-1 y la expresión de miembros de la familia C/EBP. También se han descrito roles para microRNASy RNAs grandes no codificantes y es posible que más elementos epigenéticos se sumen con las nuevas investigaciones en curso.

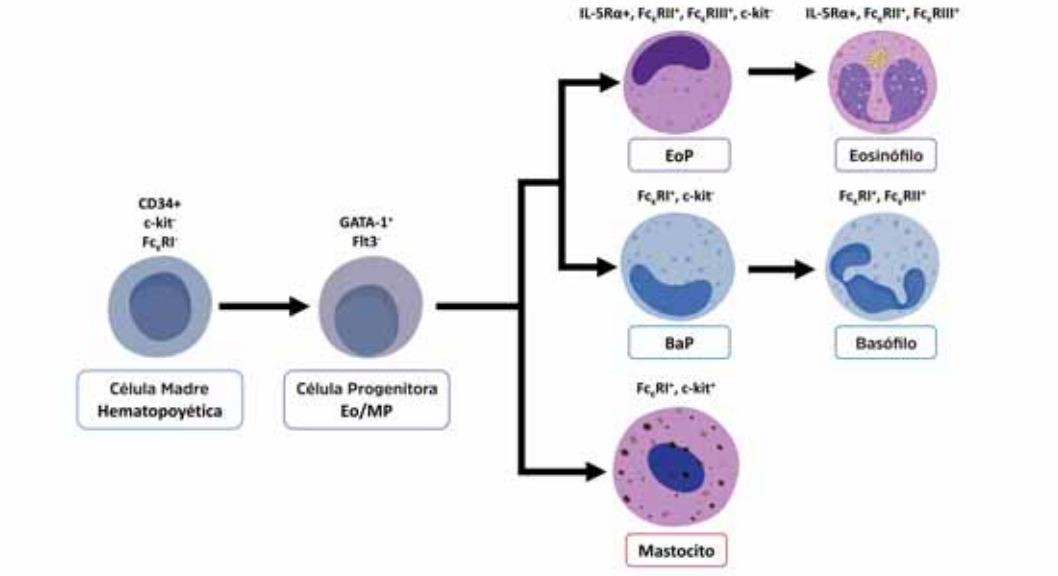


Figura 11-2. Desarrollo del linaje Eosinofílico. En el paradigma actual, la célula madre hematopoyética da lugar a la célula progenitora de eosinófilos, basófilos y mastocitos (Eo/MP), en cuyo desarrollo la expresión del factor de transcripción GATA-1, es clave, así como la represión de otros, como Flt3/CD135. A su vez, desde esta célula surge el progenitor eosinófilo-comprometido (EoP), el cual ya expresa la subunidad alfa del receptor de IL5. Finalmente, esta célula madura a eosinófilo y sale a circulación. Desde Eo/MP también surgen el basófilo y el mastocito, adquiriendo sus propios marcadores. Recientemente, estudios de expresión celular han sugerido una cercanía mayor entre los linales eosinofílico y basofílico, distanciándose de los mastocitos. $Fc_\varepsilon R$, receptor para IgE (I, alta afinidad; II, afinidad intermedia, III, baja afinidad); IL5Rα, subunidad alfa del receptor de IL-5; Flt3, receptor tirosina kinasa relacionado con Fms.

Frente a reacciones de hipersensibilidad, respuesta inmunitaria frente a parásitos, entre otros estímulos pro-eosinofílicos fuertes, la maduración de los eosinófilos se ve notablemente estimulada por la **IL-5**, amplificando la proliferación y diferenciación terminal de los precursores eosinofílico-comprometidos en médula ósea. La IL-5 es producida tanto por células del sistema inmunitario innato como adaptativo, tales como mastocitos, células tipo 2 linfoides innatas y linfocitos T helpers tipo 2 (Th2). Experimentos con ratones K.O. para el gen de la IL-5, han demostrado que esta citoquina es necesaria para elevar la respuesta eosinofílica frente a alérgenos y parásitos, mas no para mantaner un número basal de estos, aunque su ausencia da lugar a recuentos basales más bajos de lo normal. Además de la IL-5, otras citoquinas también participan en la estimulación eosinofílica, aunque en menor medida, tales como la IL-3, factor estimulador de colonias garnulocíticas y macrofágicas (GM-CSF) y la familia de las eotaxinas (quimioquinas quimiotácticas de eosinófilos) como CCL1, CCL24 y CCL26.

2.2. Contenido de los gránulos y secreción

Si bien los eosinófilos cuentan con la presencia de mitocondrias, cuerpos lipídicos, vesículas sombrero (EoSVs), RE y Golgi, lo más característico de estas células al ser miradas al microscopio en un frotis con tinción de hematoxilina-eosina, es la presencia de gránulos rosados en su citoplasma. De hecho, los eosinófilos presentan dos tipos de gránulos citoplasmáticos: **gránulos primarios de eosinófilos** y **gránulos secundarios**. Los gránulos primarios contienen a la proteína básica mayor-1 (MBP-1), la proteína catiónica eosinófila (ECP), la peroxidasa eosinófila (EPX), la neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN), la proteína de los cristales Charcot-Leyden o galectina-10 (CLC) y algunas citoquinas. Los gránulos secundarios derivan de la maduración de los primarios, por lo que predominan en las formas finales de metamielocitos esoinófilos y eosinófilos maduros. Estos almacenan a la enzima arilsulfatasa, histamina, MBP-1, EDN, ECP y EPX. Una vez estimulados, los eosinófilos secretan **mediadores** derivados de la acción enzimática sobre lípidos de membrana y presentes en cuerpos lipídicos: leucotrieno C_4 (LTC_4), leucotrieno B_4 (LTB_4), ácido 15-Hidroxieicosatetraenoico (15-HETE) y factor activador de plaquetas (PAF). Los eosinófilos pueden sintetizar varias **citoquinas proinflamatorias** y se han detectado en ellos, mRNA para: IL-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-16, factores de crecimiento (TGFα, TGFβ, TNFα, GM-CSF), IFNγ y algunas quimioquinas.

2.3. Fenotipo de la superficie celular

La superficie de los eosinófilos está abundantemente cubierta de múltiples receptores. Algunos de ellos como CCR3, IL-5R y Siglec8 (lectina-8 de unión a ácido siálico similar a inmunoglobulina), son característicos, aunque no exclusivos, mientras que EMR1 (receptor hormonal tipo-1 similar a mucina que contiene un módulo similar a EGF) parece ser exclusivo. En efecto, EMR1 también constituye un marcador específico de eosinófilos, aunque su función es aún desconocida. Sin embargo, se ha propuesto que su bloqueo con anticuerpos podría constituir

una diana terapéutica para tratar desórdenes asociados a eosinofilia. El receptor CCR3 ya mencionado, une múltiples ligandos, tales como eotaxina-1, -2 y -3 (CCL11-24 y -26). Estas eotaxinas, junto con la IL-5, son los principales factores para la maduración, reclutamiento y migración de los eosinófilos. Además, los eosinófilos expresan una notable cantidad de receptores de citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión, que le permiten migrar desde el endotelio vascular hacia los espacios tisulares donde es requerido. De entre todos los receptores de la superficie del eosinófilo, destacan aquellos cuyos ligandos son clave para la diferenciación, maduración activación y supervivencia desde médula ósea y hacia los tejidos. Estos son las **subunidades alfa de los receptores para IL-3** (IL-3Rα/CD125), para IL-5 (IL-5Rα/CD125) y **el receptor de GMCSF** (GMCSF-Rα/CD116), los cuales, al unirse a su ligando, heterodimerizan con la subunidad común beta (CD131).

Los eosinófilos expresan también, una serie de receptores para inmunoglobulinas (Ig) y miembros estructurales relacionados a estas (tabla 11-1). Entre de ellos están los receptores de **IgA- FcγRII/CD32** e **IgA-FcRI/CD89**. Este último es el principal receptor para la activación eosinofílica mediada por IgA, siendo muy relevante para la acción de estas células en el tracto gastrointestinal. El receptor de Ig más conocido en los eosinófilos, dada su relevancia fisiopatológica, es **receptor de Fc de IgE de baja afinidad ($Fc_{\varepsilon}RIII$).** Por otro lado, los eosinófilos carecen de la expresión de la subunidad beta del receptor de IgE de alta afinidad (**$Fc_{\varepsilon}RI$**), que sí es expresada en basófilos y mastocitos. También presentan receptores para fraccciones del complemento, como C5aR, CR1 y CR3, al igual que los basófilos.

Tabla 11-1. Receptores para inmunoglobulinas y fracciones del complemento en los eosinófilos y basófilos

	FcεRI	FcεRII	FcεRIII	FcγRIII	C5aR	CR1	CR3
Eosinófilos	-	+	+	+	+	+	+
Basófilos	+	-	-	+	+	+	+

$Fc_{\varepsilon}R$, receptor para IgE (I, alta afinidad; II, afinidad intermedia, III, baja afinidad); FcγRIII, receptor para IgG de baja afinidad; C5aR, receptor de C5a; CR1, receptor de C3b; CR3, receptor de iC3b.

Finalmente, los eosinófilos expresan **receptores de reconocimiento de patrones** (PRR) que le permiten a estas células identificar moléculas asociadas a microorganismos patógenos (helmintos, hongos y bacterias), dentro del contexto de la respuesta inmunitaria innata. Un interesante grupo de receptores presentes en los eosinófilos, son los **receptores activados por proteasas** PAR-1 y PAR-2, los cuales, al ser escindidos por proteasas asociadas a alérgenos, podrían jugar un rol relevante en la activación de estas células.

2.4. Activación y migración de los eosinófilos

En condiciones normales, la mayoría de los eosinófilos circulantes se establecen en superficies mucosas, especialmente a nivel del tracto gastrointestinal: desde el esófago hasta el colon. Pueden permanecer en los tejidos por varios días- en promedio unos 6- aunque esto no se ha establecido aún con claridad. La adhesión incial de los eosinófilos al endotelio está mediada por el ligando de P-selectina (CD162) que se une a la P-selectina expresada en la célula endotelial activada. Menos claros son los roles de los ligandos de L-selectina y E-selectina en el eosinófilo, aunque sí son expresados. En los subsecuentes pasos de "rolling", "flattening" y diapédesis (figura 11-3), son importantes una serie de integrinas en la superficie del eosinófilo, tales como integrinas LFA-1 (antígeno asociado a función linfocítica), Mac-1, VLA-4 (antígeno muy grande-4) e integrina $\alpha_4\beta_7$ (LPAM-1), las que le permiten unirse al endotelio a través de moléculas de adhesión vascular como VCAM-1/CD106 e ICAM-1/CD54. En la fase de migración transendotelial, son importantes la participación de moléculas endoteliales como PECAM (molécula de adhesión plaquetaria/endotelial), ICAM-1, VCAM-1 así como eotaxinas y otras moléculas quimioatractantes.

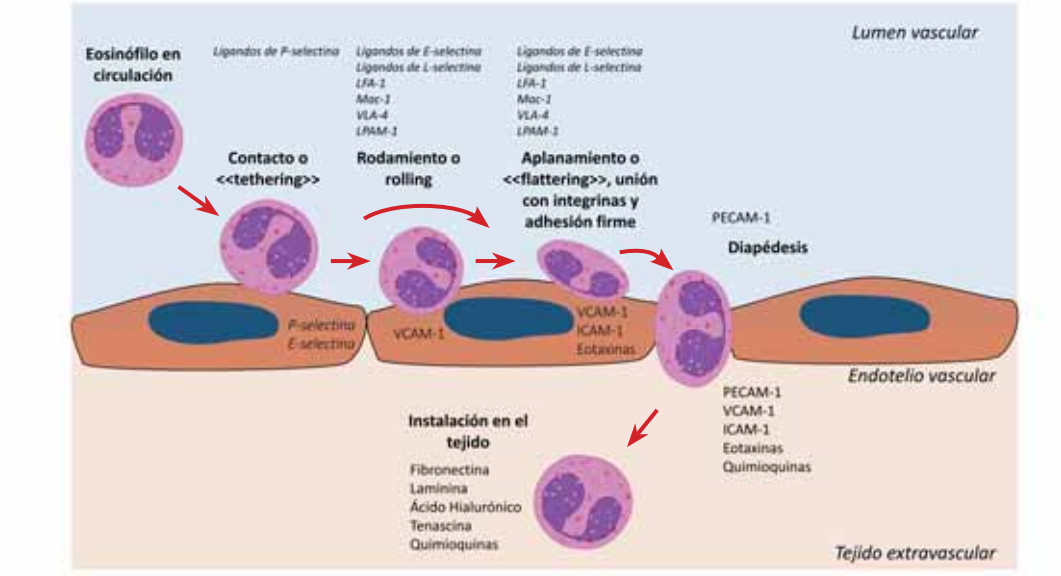


Figura 11-3. Mecanismo de reclutamiento, adhesión y extravasación de los eosinófilos. Se muestran las moléculas implicadas en el proceso expresadas en el endotelio (abajo) y en el eosinófilo (arriba). VCAM-1: molécula de adhesión vascular-1, ICAM-1: molécula de adhesión intercelular-1, PECAM-1: molécula de adhesión plaquetaria/endotelial-1, LFA-1: antígeno asociado a función linfocítica-1, VLA-4: antígeno muy grande-4, LPAM-1 (inrtegrina $\alpha_4\beta_7$)

La quimiotaxis y la adhesión a las células endoteliales y a la matriz extracelular parecen ser controladas por la respuesta inmune de células T y la subsecuente liberación de citoquinas. Las citoquinas liberadas en procesos alérgicos son las que participan en respuestas inmunes tipo Th2 (IL-4, IL-5), en cambio en la re-

acción de hipersensibilidad de tipo retardada (DTH) se encuentran citoquinas asociadas a respuesta tipo Th1 (Ej. IL-2, IFNγ). La liberación de IL-5 por LTh2 sensibilizados luego de su estimulación con antígenos específicos, se puede asociar al desarrollo de una exagerada respuesta eosinofílica durante enfermedad alérgica.

Las citoquinas además de participar en la diferenciación de los eosinófilos a partir de los precursores, contribuyen a su acumulación en el tejido inflamado. En esta última función participan principalmente IL-3, IL-5, GM-CSF, PF4, LTB4, IL-8 y RANTES/CCL5. Dado que el eosinófilo maduro circulante es una célula diferenciada incapaz de proliferar, su activación por citoquinas y quimioquinas tiene efectos principalmente en el reclutamiento, secreción de factores proinflamatorios y una mayor sobrevida celular. En este sentido, IL-3, IL-5 y GM-CSF prolongan la sobrevida de los eosinófilos, tanto *in vitro* como en los tejidos y aumentan su capacidad citotóxica. En efecto, agentes biológicos anti-IL-5, logran disminuir el número de eosinófilos en tejido pulmonar en condiciones de asma y en el tejido intestinal, en condiciones de esofagitis eosinofílica. No ocurre lo mismo con los eosinófilos del intestino delgado en condiciones normales, por lo que la IL-5 es un factor relevante, aunque no el único para la sobrevida del esosinófilo tisular, siendo los candidatos más prometedores, la IL-3 y el GM-CSF, como se mencionó más arriba. No obstante, tratamientos con anticuerpos bloqueadores de GM-CSF en personas con asma, no han dado los resultados esperados, por lo que aún queda mucho por dilucidar en este aspecto. En varias patologías, estos sistemas reguladores de la activación y movilización de eosinófilos se ve alterada y la cifra absoluta de eosinófilos en la sangre se ve aumentada (eosinofilia). Esto ocurre en condiciones tales como infecciones parasitarias, enfermedades alérgicas, neoplasias, algunos fármacos y enfermedades mieloproliferativas.

2.5. Función de los eosinófilos

La teoría prevalente actual para la función de los eosinófilos es su participación en la respuesta inmunitaria innata frente a parásitos, especialmente frente a gusanos helmintos (nemátodos y platelmintos). Si bien está demostrado que la secreción eosinofílica es importante en la muerte de estos parásitos y la detención de este tipo de infecciones, estudios en ratones deficientes en eosinófilos a través del K.O. para *GATA-1* (ΔdblGATA) y el doble K.O. para MBP-1 y EPX ($MBP1^{-/-}$, $EPX^{-/-}$), sugieren que aún en ausencia de estas células, existe una importante respuesta inmunitaria contra los helmintos. Esto ha puesto dudas sobre su importancia evolutiva en la protección contra gusanos parásitos. Además, estos modelos animales han demostrado ser completamente viables, al menos en condiciones de bioterio normales. Sin embargo, su extendida presencia en vertebrados, sugiere que a pesar de no ser imprescindibles en la respuesta inmunitaria contra parásitos, juegan un rol importante. A continuación, se describirán algunas de las funciones más descritas de los eosinófilos.

2.5.1. Infecciones parasitarias

El aumento de eosinófilos tanto en sangre como en sitios extravasales, se da característicamente en infecciones por gusanos helmintos. Los eosinófilos pueden adherirse a la superficie de estos parásitos y liberar sustancias nocivas, a través de la citotoxicidad transmitida por células con dependencia de anticuerpos (ADCC). También pueden unirse y atacar mediante elementos del complemento como C3c, a través del receptor CD11b. Menos establecida es su función protectora efectiva frente a este tipo de infecciones, donde en algunos casos previenen focos infectivos secundarios por *Trichuris muris* en ratones, pero en otros casos, solo aíslan y enquistan a las larvas como en el caso de *Trichinella*, protegiéndola de otros ataques del sistema inmunitario. Aún así, en seres humanos se ha observado que la eosinofilia se relaciona con una mayor resistencia a la reinfección por *Schistosoma haematobium*. Por ahora, se sigue considerando que los eosinófilos son importantes en respuesta a infecciones parasitarias.

2.5.2. Infeciones fúngicas

Experimentos en ratones, sugieren que la presencia de eosinofilia se relaciona con una respuesta protectora frente a infecciones por hongos que se han diseminado. Por otro lado, muchas infecciones fúngicas cursan con eosinofilia, aunque siendo una respuesta más bien moderada. Sin embargo, la eosinofilia puede ser marcada frente a infecciones fúngicas con el resultado de alergias, como la alergia broncopulmonar por aspergillus y la sinusitis fúngica. Uno de los mecanismos fungicidas en los que los eosinófilos participarían, sería a través de la formación de Trampas Extracelulares de ADN (EETs), como parte de la respuesta inmunitaria innata.

2.5.3. Infeciones virales

Muchas infecciones virales cursan con una eosinofilia tisular pero no sanguínea, como en el caso de miocarditis viral y neumonía por el virus sincicial respiratorio. Por el contrario, frente al VIH, muchos pacientes experimentan una eosinofilia en sangre, a través de algún mecanismo inductor no determinado aún. Interesantemente, se ha observado que pacientes con asma y un recuento absoluto de eosinófilos en sangre de a lo menos 150 células/µl, parecen estar más protegidos de morir por COVID-19 que los con recuentos inferiores. Otros estudios sugieren que la eosinopenia en pacientes con COVID-19 se asocia a un peor progreso de la enfermedad y al aumento de marcadores de la coagulación (dímero D) y de disfunción renal (aumento de uremia y creatininemia). En este mismo sentido, no se ha detectado una eosinofilia pulmonar relevante dentro del daño inducido por SARSCoV-2 hasta la fecha y, por el contrario, los eosinófilos podrían, en este caso, estar actuando en la inmunomodulación frente al virus, favoreciendo un mejor pronóstico. Sin embargo, esto aún no ha sido claramente establecido y una eosinofilia tardía post COVID-19 podría asociarse más bien a las complicaciones inflamatorias que esta enfermedad deja como secuela en algunos pacientes.

Ensayos con el virus sincicial respiratorio y de la influenza A en ratones, siguieren un rol protector por parte de los eosinófilos. Sin embargo, en seres humanos, personas con asma y recuentos de eosinófilos elevados en esputos bronquiales, se asocian a infecciones respiratorias más severas, mientras que frente a infecciones por rinovirus, la eosinofilia no muestra mejor ni peor pronóstico.

2.5.4. Infecciones bacterianas

Lo más frecuente es la asociación entre un bajo recuento de eosinófilos (eosinopenia) con infecciones bacterianas agudas. Sin embargo, se ha sugerido un rol defensivo en algunas infecciones bacterianas crónicas producidas por mycobacterium y por *Clostridium difficile*. Si bien los eosinófilos son capaces de expresar receptores tipo Toll (TLR), secretar proteínas con capacidad antibacteriana y participar en conjunto con los neutrófilos de trampas extracelulares, la importancia de estos en las infecciones bacterianas no se ha establecido aún satisfactoriamente.

2.5.5. Respuesta antitumoral

Si bien se ha establecido la presencia de eosinófilos en el microambiente tumoral, su rol en el sistema inmunitario frente a la célula cancerígena aún no es claro. Se ha sugerido una relación positiva de la presencia de eosinófilos en los tumores para el pronóstico de la enfermedad en cáncer de mama y melanoma, una relación negativa en cáncer de pulmón y linfoma Hodgkin y sin significancia para cáncer cerebral. Tampoco se ha observado una clara relación entre la eosinofilia sanguínea y el valor predictivo pronóstico y como mucho, podría indicar la presencia de respuesta inflamatoria tipo 2. Tampoco los modelos animales eosinopénicos ni pacientes con esta condición parecen tener un mayor riesgo de cáncer, por lo que su función en este aspecto es aún desconocida.

2.5.6. Regulación del sistema inmunitario y hemostático.

Los eosinófilos son capaces de fagocitar y eliminar patógenos invasores, aunque con menor capacidad que los neutrófilos. Esta capacidad a su vez, se relaciona con su función presentadora de antígenos. Por otro lado, los eosinófilos secretan CXCL8/IL-8, una quimioquina atractante de neutrófilos y linfocitos T, por lo que tendría un rol en el reclutamiento de estas células. La IL-2 liberada desde eosinófilos tendría un rol en el desarrollo de la respuesta alérgica, asociada a la liberación de IL-4, la cual es la citoquina mejor descrita para el desarrollo de la respuesta Th2 y asociada a el cambio isotípico a IgE en los linfocitos B. Por otro lado, la liberación de IL-4 asociada a la actividad eosinofílica, puede inducir la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio como VCAM, favoreciendo el reclutamiento de más eosinófilos. La liberación de IL-6 por parte de los eosinófilos, cumpliría un rol similar al de IL-4 en el cambio isotípico a IgE en Linfocitos B. Por el contrario, la liberación de IL-10 por parte de al menos una subpoblación de eosinófilos puede tener efectos inmunosupresores, los que podrían ser aprovechados por parásitos como *Trichinella spiralis* para evadir la toxicidad por actividad de iNOS (óxido nítrico sintasa inducible).

Se ha observado que los eosinófilos pueden interactuar químicamente con las plaquetas circulantes. La liberación de mediadores eosinofílicos como PAF, MBP y EPX puede promover la activación plaquetaria. Del mismo modo, las plaquetas liberan CCL-5, CCL-17, CXCL4 e IL1β, que favorecen la liberación de citoquinas desde los eosinófilos, de manera que ambas células potencian el reclutamiento y extravasación de los eosinófilos y la activación plaquetaria. Además, como se mencionó más arriba, los eosinófilos pueden alterar el fenotipo de la célula endotelial hacia uno más pro-inflamatorio con la expresión de moléculas de adhesión y además, a través de la liberación de EPX, favorecer la expresión vascular del factor tisular, favoreciendo la aparición de eventos cardiovasculares.

2.6. Síndromes eosinofílicos

Por lo general, las patologías de mayor frecuencia de eosinofilia se asocian con un aumento en el recuento absoluto de eosinófilos (>500 µ/l) y en algunos casos pueden llegar al nivel de hipereosinofilia periférica (>1.500/µl). Esto se conoce como Síndrome hipereosinofílico. El tratamiento base es el uso de corticoides para la eosinofilia misma, aunque dependerá de la causa. A continuación, se presentan algunos subtipos clínicos de síndromes hipereosinofílicos (figura 11-4).

2.6.1 Síndrome hipereosinofílico mieloide

Se producen debido a una neoplasia mieloide. Pueden representar hasta un 20% de los casos de síndrome hipereosinofílico. Se asocia a mutaciones en el cromosoma 4 frecuentemente, con la formación de la proteína de fusión FIP1L1/PDGFRA, una tirosina quinasa asociada a la transformación celular maligna y las casuas de muerte se dan predominantemente por fibrosis endomiocardítica y eventos trombóticos. Entre las características clínicas están esplenomegalia, trombocitopenia, anemia, aumento sérico de vitamina B12, eosinófilos hipogranulosos y mielofibrosis. Muchos pacientes responden favorablemente al imatinib, un inihibidor de la tirosina quinasa aberrante.

2.6.2. Síndrome hipereosinofílico linfocítico

Se dan con eosinofilias acompañadas de la presencia de linfocitos T aberrantes hiperproliferativos hiperproductores de IL-5 u otra citoquina pro-eosinofílica. Hasta un 30% de los pacientes desarrolla linfoma con el tiempo. Elevaciones de IgE y CCL17 son comunes, con manifestaciones cutáneas como el angioedema. También se puede presentar la hipergammaglobulinemia.

2.6.3. Síndrome hipereosinofílico de superposición

Ocurre en síndromes hipereosinofílicos de un solo órgano, como el desorden eosinofilico gastrointestinal, pero con eosinofilias periféricas, lo que puede ser derivado de un aumento de IL-5 por parte de los linfocitos T.

2.6.4. Síndrome hipereosinofílico asociado

Se refiere a aquellos síndromes con causas definidas, cuyo tratamiento normalmente no va orientado a la hipereosinofilia en sí, sino a las causas de origen. Estas pueden ser infecciones parasitarias, hipersensibilidad a fármacos, tumores sólidos y síndromes de inmunodeficiencia (como con el VIH).

2.6.5. Síndrome hipereosinofílico familiar

Se da en individuos con historia familiar de eosinofilia persistente, de causas comúnmente desconocidas. La asociación genética mejor conocida es la transmisión autosómica dominante correspondiente a la región cromosómica 5q31-33, que contiene al cluster de IL-5. La eosinofilia se presenta desde el nacimiento, pero es asintomática en la mayoría de los casos.

2.6.6. Síndrome hipereosinofílico idiopático

Son aquellos cuyas causas permanecen indefinidas. Se divide en i) Eosinofilia de significado incierto: normalmente benigna, asintomática y persistente y ii) Con síntomas, pero sin características de mieloproliferativas ni linfoproliferativas. Este último puede ser episódico o complejo si compromete órganos persistentemente. Cuando se afecta algún órgano, estos suelen ser piel, sistema gastrointestinal o pulmonar.

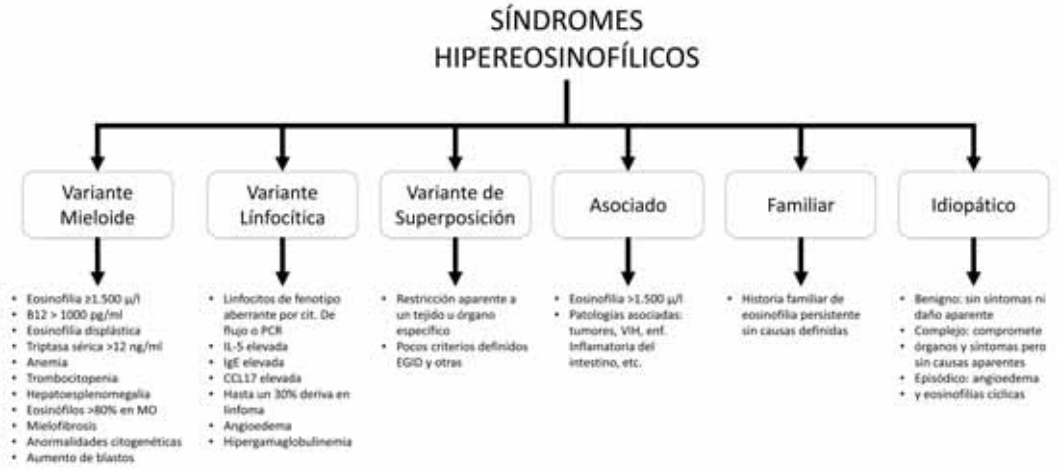

SÍNDROMES HIPEREOSINOFÍLICOS
Variante Mieloide
Variante Linfocítica
Variante de Superposición
Asociado
Familiar
Idiopático
• Eosinofilia ≥1.500 µ/l
• B12 > 1000 pg/ml
• Eosinofilia displástica
• Triptasa sérica >12 ng/ml
• Anemia
• Trombocitopenia
• Hepatoesplenomegalia
• Eosinófilos >80% en MO
• Mielofibrosis
• Anormalidades citogenéticas
• Aumento de blastos
• Linfocitos de fenotipo aberrante por cit. De flujo o PCR
• IL-5 elevada
• IgE elevada
• CCL17 elevada
• Hasta un 30% deriva en linfoma
• Angioedema
• Hipergamaglobulinemia
• Restricción aparente a un tejido u órgano específico
• Pocos criterios definidos EGID y otras
• Eosinofilia >1.500 µ/l
• Patologías asociadas: tumores, VIH, enf. Inflamatoria del intestino, etc.
• Historia familiar de eosinofilia persistente sin causas definidas
• Benigno: sin síntomas ni daño aparente
• Complejo: compromete
• órganos y síntomas pero sin causas aparentes
• Episódico: angioedema
• y eosinofilias cíclicas

Figura 11-4. Clasificación de los Síndromes Hipereosinofílicos y algunas de sus características más relevantes.
MO: médula ósea; EGID: desorden gastrointestinal asociado a eosinofilia; enf.: enfermedad.

2.7. Trastornos inmunológicos con eosinofilia

En la gran mayoría de los casos, estas patologías presentan una eosinofilia secundaria a algún trastorno que activa exageradamente a la producción y acción

de los eosinófilos, como en la rinitis y rinoconjuntivitis alérgica, asma bronquial, bronquitis eosinofílica, dermatitis atópica, mastocitosis y enfermedades autoinmunes. Por otro lado, existen varios trastornos de inmunodeficiencias primarias y secundarias que presentan eosinofilia, como en el síndrome de hiper-IgE, síndrome de Omenn, síndrome linfoproliferativo autoinmune y en el rechazo al transplante de órganos.

3. BASÓFILOS

Los basófilos deben su nombre, al igual que los eosinófilos, por su tendencia a teñirse fuertemente con colorantes usados en la clínica, estando en este caso, asociados a la tinción básica, dado el contenido acídico de sus gránulos. Su aspecto al frotis teñido con May-Grünwald Giemsa es, por lo tanto, muy característico, con la presencia de notorios gránulos citoplasmáticos de aspecto violáceo-oscuro rodeando un núcleo de aspecto bi o trilobulado (figura 11-5). En el recuento sanguíneo constituyen el leucocito menos frecuente, con un 0 -1% (0 a 125/ µl) de sangre. A menudo se le compara con los mastocitos o células cebadas, su equivalente residente en tejidos, ya que comparten aspectos morfológicos y funcionales similares, aunque las últimas investigaciones sugieren que, si bien comparten funciones en la respuesta inmunitaria, sus roles no son del todo redundantes entre sí.

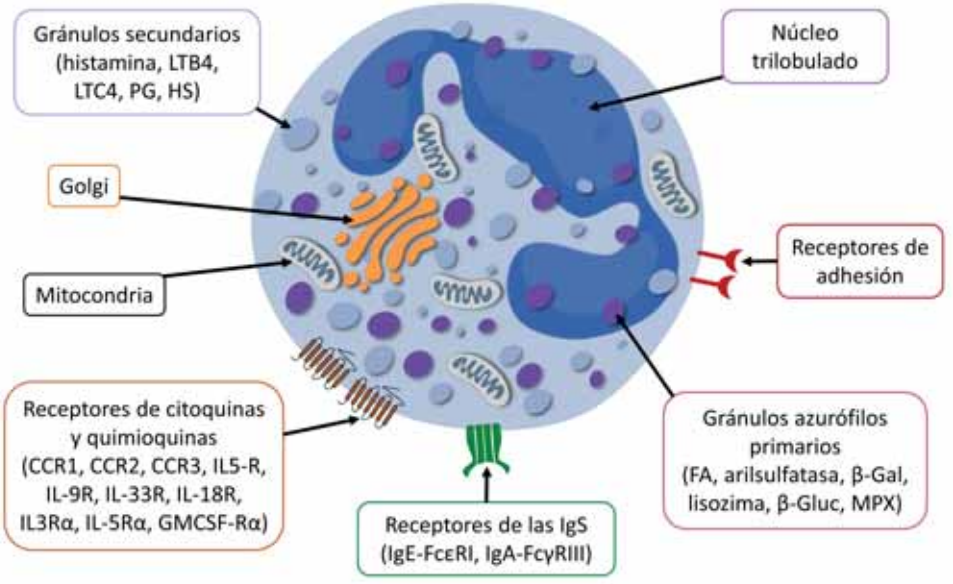


Figura 11-5. Estructura general y componentes más destacables de los basófilos.

3.1. Origen en médula ósea

Los basófilos se generan en médula ósea desde progenitores granulocíticos-monocíticos, que a su vez dan lugar a precursores del linaje Eo/MP. (Figura 11-2).

Se han propuesto modificaciones al modelo clásico, donde existiría un precursor multipotente específicamente comprometido con la línea eosinófila-basófila-mastocítica caracterizado por su positividad a la expresión del factor de transcripción GATA-1. A diferencia de los mastocitos, los cuales salen de médula ósea no completamente desarrollados y terminan de madurar en los tejidos donde son reclutados, los eosinófilos y basófilos ya circulan en forma madura y se mueven hacia los tejidos, donde son reclutados para su activación. Además, los mastocitos van tempranamente a los tejidos donde terminan residiendo, sin casi encontrarse en circulación en condiciones normales. Los basófilos, en cambio, sí circulan por un corto período en sangre, de manera similar a los eosinófilos. Otra diferencia importante es su vida media, los mastocitos pueden durar entre 2 a 3 semanas en los tejidos, mientras que los basófilos no suelen pasar las 60 horas. La diferenciación a basófilos y mastocitos desde células inmaduras ($CD34^+$, c-kit^-, FcεRI-) ocurre a través de varias etapas en que estos y otros marcadores de membrana se van modificando. Los matocitos maduros presentan el fenotipo $Fc_\varepsilon RI^+$ y c-kit^+, mientras que los basófilos son $Fc_\varepsilon RI^+$, c-kit^-, $CD23^+$. Además, al igual que los eosinófilos, estas células son $CD25^+$ y $CD125^+$. En la diferenciación de basófilos, la principal citoquina que participa es IL-3. También participan GM-CSF, IL-4 e IL-5 (esta última promueve además, la diferenciación de eosinófilos, como ya se vio anteriormente) y GM-CSF. El factor TGF-β en presencia de IL-3, suprime la diferenciación hacia eosinófilos y favorece la diferenciación hacia los basófilos. A nivel de vías transduccionales, la inactivación del factor de transcripción C/EBPα y la activación de GATA-2, conduce a la diferenciación en basófilos y mastocitos, inhibiendo la de esoinófilos. Sin embargo, la reactivación posterior de C/EBPα es importante para la maduración hacia basófilos y no mastocitos.

3.2. Contenido de los gránulos, activación y secreción

Sus característicos gránulos citoplasmáticos ya están presentes desde su etapa de promielocitos basófilos, pasando por mielocito y metamielocito. Los basófilos contienen dos tipos de gránulos: primarios y secundarios (figura 11-5). Los gránulos primarios azurófilos consisten en lisosomas con hidrolasas ácidas bactericidas (fosfatasa ácida, arilsulfatasa, beta-galactosidasa, beta-glucoronidasa, lisozima y mieloperoxidasa). Los secundarios o específicos contienen sustancias vasoactivas dilatadoras como histamina y heparánsulfato, el anticoagulante heparina y prostaglandinas y leucotrienos (LTB_4, LTC_4), los cuales tienen efecto broncoconstrictor. Este contenido explica su marcado rol en la respuesta inmune innata y su intervención en cuadros de hipersensibilidad como la rinitis alérgica. A pesar de que comparten varias moléculas de secreción con los mastocitos, siendo la más conocida la histamina, existen diferencias entre los basófilos y aquellos. Así, la liberación de MIP1α/MIP5/CCL15 se da en basófilos y no en mastocitos y tiene funciones quimioatractantes para monocitos y eosinófilos. En cambio, el óxido nítrico (NO), prostaglandinas D_2 (PGD_2), PGF_2, tromboxano A_2, triptasa, carboxipeptidasa A, IL-5, IL-8, IL-10, TNFα, TGF-β, e IFNγ son secretados solo por mastocitos y no por basófilos. Los basófilos son capaces de sintetizar y secretar IL-4 e IL-13, al igual que los mastocitos. La secreción de IL-4 es particu-

larmente relevante para los basófilos, ya que son las principales células CD3- en inducir la respuesta Th2 a través de esta interleuquina. Los basófilos pueden ser activados tanto por la unión de la IgE a sus receptores de alta afinidad FcεRI, como por estímulos independientes de IgE, como péptidos bacterianos, ligandos de TLR, adenosina y nucleótidos extracelulares, así como varios tipos de citoquinas. Finalmente, son varios los factores que pueden activar la secreción de mediadores de inflamación por parte de basófilos y mastocitos. Entre ellos, la unión de una molécula de IgE (o IgG) y su respectivo antígeno a los FcεRI (o FcγRII), anafilotoxinas (C3a y C5a), lectinas (ej. concavalina A), algunas citoquinas (IL-1 y MIP-1α).

Tanto basófilos como mastocitos participan en las etapas iniciales del proceso inflamatorio, pero en las etapas más avanzadas de reparación, solo lo hacen los mastocitos. Así, inicialmente ambos secretan mediadores inflamatorios comunes (histamina, IL-4, quimioquinas), de basófilos (IL-13) y de mastocitos (TNFα), moléculas que durante el proceso van disminuyendo. Por su parte, los mastocitos siguen liberando otros mediadores durante el desarrollo del proceso, ahora antiinflamatorios (IL-10, TGF-β, etc.) y más adelante, moléculas que favorecen la reparación tisular (proteinasas, factores de crecimiento y otras citoquinas). Varios fármacos antialérgicos y antiinflamatorios inhiben la secreción de mediadores desde los basófilos y mastocitos; sus acciones son múltiples y variadas; entre otros se incluyen agonistas de B_2, antagonistas de H_1, corticoides y ciclosporina A.

3.3. Fenotipo de la superficie celular

Al igual que los eosinófilos, los basófilos pueden ser atraídos a zonas de inflamación y sufrir extravasación, procesos mediados por la sobre-expresión de receptores de membrana como CCR1, CCR2 y CCR3 en respuesta a RANTES y MCP-1. También presentan receptores para las IL-9, IL-5, IL-3 IL-33 e IL-18 y son sensibles a GM-CSF. Estas características entre otras, han llevado a pensar que los basófilos son más cercanos al linaje de eosinófilos que al de los mastocitos, a diferencia de lo que se pensaba anteriormente. Sin dudas su receptor más estudiado es el receptor Fc de IgE de alta afinidad, FcεRI, presente también en mastocitos. Comprende un tetrámero con una cadena alfa, una beta y un dimero gamma unido por puentes disúlfuros (figura 11-6). Las cadenas alfa y gamma no son específicas para este receptor, a diferencia de la beta. Este receptor es activado cuando se une la región Fc de una IgE que se encuentra unida al antígeno, el que a su vez une una segunda IgE. El sitio de unión al ligando está en la subunidad alfa, que es del tipo de la superfamilia de las inmunoglobulinas, mientras de beta y gamma no se unen al receptor, pero son las que transmiten y amplifican la señal hacia el medio intracelular, poseyendo motivos ITAM (motivos de activación basados en tirosina de inmunoreceptores). Esta unión complejo inmune-receptor induce distintas vías transduccionales que inducirán la expresión de genes de interleuquinas, citoquinas y la activación de la PLCγ (fosfolipasa C gamma), que conducirá esta última, a un aumento de calcio citosplasmático que provocará a su vez, la degranulación del basófilo.

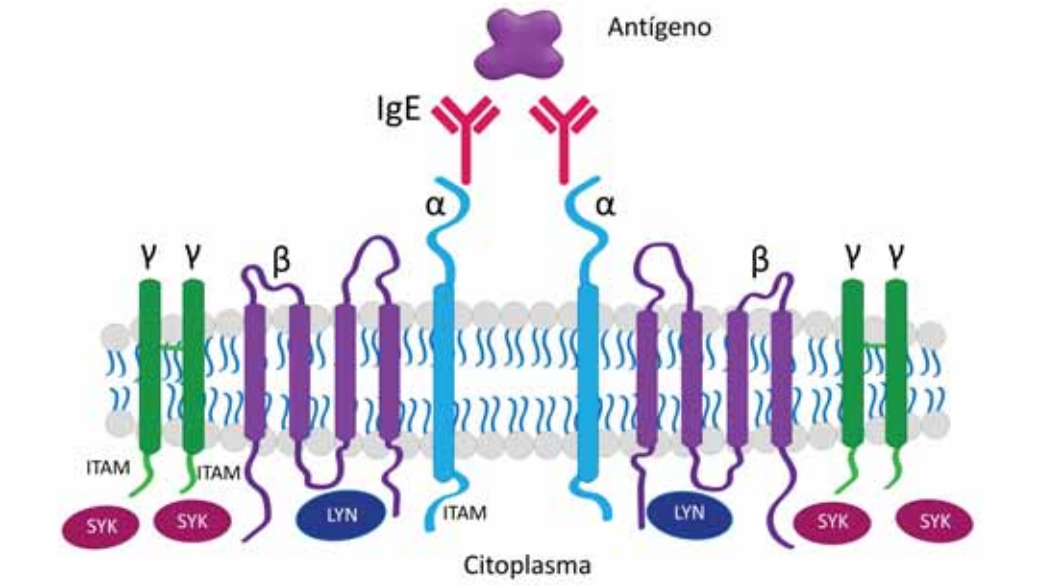


Figura 11-6. Estructura simplificada del complejo antígeno-IgE- FcεRI. Una vez que dos IgEs unidas al antígeno son reconocidas por su sitio Fc por la subunidad alfa del receptor FcεRI, se induce la dimerización de los receptores y se activan la tirosina kinasa Lyn en la subunidad beta, quien fosforila en los ITAM (motivos de activación basados en tirosina de inmunoreceptores) al receptor, reclutando y activando a la tirosina kinasa SYK, desencadenando la activación de vías transduccionales que terminarán induciendo la degranulación de los basófilos.

3.4. Función de los basófilos

Los basófilos participan activamente en la eliminación de gusanos helmintos, propiciando la respuesta inmunitaria Th2, liberando IL-4 e IL-13. La secreción de IL-6, hasta hace poco solo reportada para mastocitos, también se ha observado en basófilos y se ha asociado a la diferenciación de los linfocitos TCD4+ hacia el fenotipo proinflamatorio Th17. Esta función también tiene implicancias fisiopatológicas como en las enfermedades inflamatorias de pulmón e intestino. Actualmente, se considera la participación de los basófilos tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa. A continuación, mostraremos algunas de sus funciones reportadas.

3.4.1. Regulación del sistema inmunitario

Recientemente se ha propuesto que la escasez de basófilos en el torrente sanguíneo se relaciona con su rol inmunomodulador, en lugar de limitarse a ser un elemento celular de la respuesta innata. En este sentido, se ha propuesto que existen al menos dos subpoblaciones de basófilos: unos activados por IL-3 y otros por TSLP (linfopoietina estromal del timo), induciendo estos últimos, una respuesta inflamatoria tipo 2. Por otra parte, los basófilos activados por TLR-4 y-2 favorecen el fenotipo M2 en macrófagos, pudiendo participar en la fisiopatología de enfermedaes autoinmunes como la pancreatitis autoinmune tipo-1.

La función efectora inmunitaria por excelencia de los basófilos es la inducción de la permeabilidad microvascular y la promoción de la respuesta Th2, conducente a la producción de IgE. Los basófilos también responden a elementos bacterianos como los péptidos formilados, lo que tendría importancia en procesos inflamatorios crónicos no alérgicos como en la enfermedad renal crónica. También se ha descrito un rol de los basófilos en las terapias de desensibilización secuencial contra alérgenos, en las cuales los basófilos sufren una anergia por un mecanismo no específico mediado por la MAPK p38 (proteína kinasa mitógeno-activada p38).

3.4.2. Reacciones de hipersensibilidad

Dada su relevancia en la respuesta inmune, los basófilos están involucrados en virtualmente todo tipo de reacciones de hipersensibilidad: rinitis alérgica, urticaria, alergias alimentarias, anafilaxis, etc. En efecto, los basófilos participan en las distintas temporalidades descritas para las reacciones de hipersensibilidad: inmediata, tardía y retardada (figura 11-7). En las reacciones inmediatas, los basófilos liberan histamina, LTC4, PAF y otras sustancias vasoactivas, que median la sintomatología característica anafiláctica de tipo respiratoria, cutánea y/o gastrointestinal. Esto se da en algunas alergias alimentarias, por medicamentos y picaduras de insectos. Estas son comúnmente IgE mediadas e inducen respuestas Th2. En la fase tardía, a las 6-12 h post exposición al alérgeno, los basófilos liberan IL-4 e IL-13, propiciando una vez más, la respuesta Th2 e involucrando la activación de eosinófilos. En la activación de los basófilos participan IL-3, IL-33, proteasas alergénicas, antígenos de helmintos y ligandos de TLRs. Esto se observa en la rinitis alérgica, asma y urticaria autoinmune. Finalmente, en la hipersensibilidad retardada, que toma 2-3 días, el predominio de la respuesta es de tipo mononuclear, pero son los basófilos los más importantes en el grupo granulocítico. Estos liberan IL-4 y IL-13 y su degranulación podría deberse más a estados necróticos celulares, como se ha observado en lesiones cutáneas de dermatitis de contacto, rechazo a implantes de piel, enfermedad de Chron y daño inflamatorio asociado a tumores.

3.4.3. Infecciones parasitarias

Al igual que los eosinófilos, los basófilos tienen un rol bien conocido contra las infecciones helmínticas, dada su capacidad de inducir respuestas tipo Th2 a través de la liberación de IL-4. Los basófilos, no obstante, desempeñan funciones no redundantes con los eosinófilos en este tipo de respuesta, ya que los basófilos son especialmente activos durante las reinfecciones y ayudan por lo tanto a controlarlas, como se ha evidenciado en las reinfecciones por nemátodos. En estas circunstancias, los basófilos inducen la activación de monocitos y macrófagos, promoviendo su fenotipo M2, quienes atacan a los parásitos a través de la liberación de Arginasa-1.

3.4.4. Infecciones bacterianas y fúngicas

Al igual que los otros granulocitos, los basófilos también poseen capacidad fagocítica asociada a actividad antibacteriana y antifúngica. Como ya se mencionó, los basófilos son capaces de responder frente a péptidos bacterianos de manera independiente de IgE. También se mencionó la existencia de TLR en los basófilos, de manera que a través de TLR2 y TLR4, estas células pueden participar en la respuesta inmunitaria antibacteriana. Por otro lado, se ha observado que los basófilos pueden activarse frente a la formación de complejos inmunes entre IgD y péptidos bacterianos, dando lugar al cambio de clase de IgA a IgD en linfocitos B, siendo esto útil frente a bacterias como *Moraxella catarrhalis*.

3.4.5. Asociación con cáncer

Existe evidencia de la asociación de la actividad de los basófilos con algunas neoplasias, en particular con la leucemia mieloide crónica (LMC) y aguda (LMA). Un aumento en circulación de basófilos de aspecto normal y displásico, han sido bien reportados en las fases aceleradas o blásticas de la LMC. Estas cifras pueden llegar a ser tan altas como el 70% de los leucocitos circulantes. Los recuentos absolutos de basófilos sobre los 250/µl han sido asociados a un peor pronóstico. Se desconocen las causas exactas de esta relación, pero una hipersensibilidad a la IL-3 (activadora de basófilos) asociada a la proteína de fusión BCR-ABL presente en enfermedades mieloproliferativas, se ha propuesto como un mecanismo, en base a lo observado en modelos murinos.

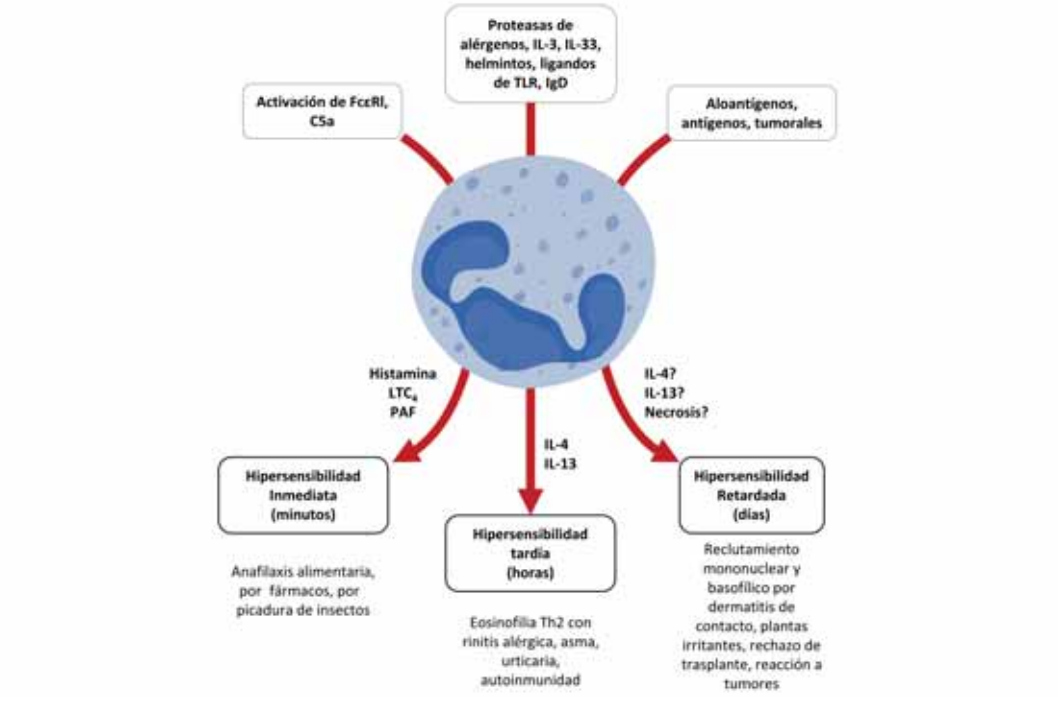


Figura 11-7. Participación del basófilo en distintas temporalidades de hipersensibilidad. Los signos de interrogación reflejan dudas sobre la participación de estos mecanismos.

3.5. Síndromes Basofílicos

La basofilia se define como un aumento absoluto periférico de basófilos por sobre los 200/µl. Esto ocurre de manera asociada a condiciones inflamatorias de carácter infeccioso, autoinmune o tumoral. Dentro de las causas infecciosas están las infecciones virales, tuberculosis, varicela, y viruela. Dentro de las autoinmunes e inflamatorias crónicas están la artritis reumatoidea y la colitis ulcerosa. Dentro de las tumorales, destacan las LMC y LMA ya comentadas en este capítulo. También se han observado en algunos síndromes mielodisplásicos, policitemia vera y LM promielocítica. Otras causas, aunque sus mecanismos aún no son bien comprendidos, son: irradiación dañina, déficit de hierro, hipotiroidismo y diabetes mellitus.

4. LECTURAS SUGERIDAS

Bingdi Yan, Junling Yang, Yan Xie, Xiaolei Tang, Relationship between blood eosinophil levels and COVID-19 mortality, World Allergy Organization Journal, Volume 14, Issue 3, 2021.

Cerutti, Lorena. "Síndrome Hipereosinofílico" Monografía. Archivos de alergia e inmunología clínica. 2018;49(1):24-42.

Chirumbolo S, Bjørklund G, Sboarina A, Vella A. The role of basophils as innate immune regulatory cells in allergy and immunotherapy. Hum Vaccin Immunother. 2018 Apr 3;14(4):815-831. doi: 10.1080/21645515.2017.1417711. Epub 2018 Jan 18. PMID: 29257936; PMCID: PMC5893214.

Cromheecke, J. L., Nguyen, K. T., & Huston, D. P. (2014). Emerging role of human basophil biology in health and disease. *Current allergy and asthma reports, 14*(1), 408. https://doi.org/10.1007/s11882-013-0408-2.

Ferastraoaru D, Hudes G, Jerschow E, et al. Eosinophilia in asthma patients is protective against severe COVID-19 illness. J Allergy Clin Immunol Pract. Published online January 23, 2021. doi:10.1016/j.jaip.2020.12.045
https://doi.org/10.1016/j.alit.2017.04.007.

Ivanhoe Ortiz-Meza, Luz Ángel Pérez-Armendáriz, Marisol Amador-Robles, Manuel Rosales-González, Sara Espinosa-Padilla, Rocío Meza-Velázquez, "Polimorfismos del receptor FcεRI y su relación con enfermedades alérgicas", Alergia, Asma, e Inmunología Pediátricas, 2018, Vol. 27 (1), pp 4-9.

Kensuke Miyake, Hajime Karasuyama, Emerging roles of basophils in allergic inflammation, Allergology International, Volume 66, Issue 3, 2017, Pages 382-391, ISSN 1323-8930.

Klion A. Hypereosinophilic syndrome: current approach to diagnosis and treatment. Annu Rev Med. 2009;60:293-306. doi: 10.1146/annurev.med.60.062107.090340. PMID: 19630574.

Klion AD, Ackerman SJ, Bochner BS. "Contributions of Eosinophils to Human Health and Disease". Annu Rev Pathol.;15:179-209. doi: 10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032756. PMID: 31977298; PMCID: PMC7604902. 2020.

Legrand F, Tomasevic N, Simakova O, Lee CC, Wang Z, Raffeld M, Makiya MA, Palath V, Leung J, Baer M, Yarranton G, Maric I, Bebbington C, Klion AD, "The eosinophil surface receptor epidermal growth factor-like module containing mucin-like hormone receptor 1 (EMR1): a novel therapeutic target for eosinophilic disorders", The Journal of Allergy and Clinical Immunology. 133 (5): 1439–47, 1447.e1–8, 2014.

Obata-Ninomiya K, Domeier PP, Ziegler SF. Basophils and Eosinophils in Nematode Infections. Front Immunol. 2020 Nov 27;11:583824. doi: 10.3389/fimmu.2020.583824. PMID: 33335529; PMCID: PMC7737499.

Ramirez GA, Yacoub MR, Ripa M, Mannina D, Cariddi A, Saporiti N, Ciceri F, Castagna A, Colombo G, Dagna L. Eosinophils from Physiology to Disease: A Comprehensive Review. Biomed Res Int. 2018 Jan.

Sarrazin, S., & Sieweke, M. H. (2016). *Eosinophils and mast cells: a lineage apart. Nature Immunology, 17(6), 609–611.* doi:10.1038/ni.3446 .

Simon, H. U., Rothenberg, M. E., Bochner, B. S., Weller, P. F., Wardlaw, A. J., Wechsler, M. E., Rosenwasser, L. J., Roufosse, F., Gleich, G. J., & Klion, A. D. (2010). "Refining the definition of hypereosinophilic syndrome". The Journal of allergy and clinical immunology, 126(1), 45–49. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.03.042.

SN Wickramasinghe, A Porwit, WN Erber, CHAPTER 2 - Normal bone marrow cells: Development and cytology, Editor(s): Anna Porwit, Jeffrey McCullough, Wendy N. Erber, Blood and Bone Marrow Pathology (Second Edition), Churchill Livingstone, 2011, Pages 19-44, ISBN 9780702031472.

Sticco KL, Pandya NK, Lynch DT. Basophilia. 2021 Mar 29. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan–. PMID: 30570986.

SECCIÓN 1.4 **HEMOSTASIA**

Capítulo 12. Hemostasia Primaria

Capítulo 13. Sistema de la Coagulación

Capítulo 14. Sistema Fibrinolítico

Capítulo

12

HEMOSTASIA PRIMARIA

Carina Pizzarossa, Cecilia Guillermo, Eduardo Fuentes e Iván Palomo G.

Resumen

1. Introducción

2. Endotelio
2.1 Estructura y funciones
2.2 Rol del endotelio indemne en la hemostasia
2.2.1 Regulación del tono vasomotor
2.2.2 Rol como "barrera"
2.2.3 Síntesis de sustancias antitrombóticas

3. Plaquetas
3.1. Membrana plaquetaria
3.1.1. Glicoproteínas
3.1.2. Receptores no glicoproteicos
3.2. Gránulos plaquetarios
3.3. Citoesqueleto plaquetario
3.4. Sistemas de membrana internos: canalicular abierto y tubular denso

4. Formación del trombo plaquetario
4.1 Injuria endotelial y fenómenos vasculares
4.2. Adhesión y extensión plaquetarias
4.3. Agregación plaquetaria
4.4. Secreción y reclutamiento

5. Secuencia bioquímica de activación plaquetaria
5.1. Vías de señalización que conducen a la activación plaquetaria
5.1.1 Señalización de activación plaquetaria mediada por receptores de adhesión
5.1.2 Señalización de activación plaquetaria mediada por receptores de reconocimiento de patrón
5.1.3 Señalización de activación plaquetaria inducida por agonistas plaquetarios solubles
5.2. Sinergia entre diferentes receptores de vías de activación plaquetaria
5.3 Redes de amplificación de señal
5.4 Revaloración de la señalización GMPc a nivel plaquetario
5.5 Señalización de integrinas de adentro-afuera (“inside- out”)
5.6 Señalización de integrina de afuera-adentro (“outside-in”)

6. Reorganización del citoesqueleto

7. Consolidación del trombo

8. Lecturas sugeridas

RESUMEN

La hemostasia primaria, es parte de un proceso más amplio que impide el sangrado anormal. La hemostasia primaria incluye la fase de vasoconstricción y la fase endotelial-plaquetaria. En este capítulo se abordará, principalmente, la segunda fase que tiene como resultado la formación de un tapón plaquetario.

En el capítulo se abordan básicamente los siguientes aspectos: la estructura y funciones del endotelio, la estructura y funciones de las plaquetas, las etapas de la hemostasia primaria (injuria endotelial, adhesión, agregación, y activación plaquetaria y la formación del tapón plaquetario).

Se quiere destacar el apartado sobre el endotelio dada su relevancia en la hemostasia primaria. Se destacan también los conceptos de señalización "inside- out" y "outside- in" y su rol en la activación plaquetaria y el rol bifásico de la vía del óxido nítrico y GMPc (guanosín monofosfato cíclico) en la activación plaquetaria (derribando la idea de que esta vía solo inhibe la hemostasia primaria).

1. INTRODUCCIÓN

La hemostasia es un proceso complejo que permite prevenir, de forma continua, la pérdida espontánea de sangre y detener la hemorragia causada por daños al sistema vascular; abarca la hemostasia primaria, la hemostasia secundaria (coagulación) y la fibrinólisis.

La hemostasia primaria incluye la fase de vasoconstricción y la fase endotelial-plaquetaria. La fase de vasoconstricción puede explicarse mejor al indicar que cuando se produce una herida o incisión en la piel, la pérdida de sangre es mínima al comienzo, aumentado después, progresivamente. Esto obedece a que se produce una vasoconstricción local rápida, por estimulación directa de los nervios simpáticos existentes en la pared de los vasos. En la fase endotelial-plaquetaria que tiene como resultado la formación de un tapón inestable de plaquetas (3-5 minutos); en esta etapa además tiene lugar una vasoconstricción por estímulo químico, provocada por sustancias vasoconstrictoras liberadas desde los gránulos plaquetarios, como la serotonina, o sintetizadas por las plaquetas activadas como el tromboxano A2 (TXA2).

Por su parte la coagulación (ver capítulo13) corresponde a una cascada de activación proteolítica de factores plasmáticos que conducen a la formación de trombina la cual actuando sobre el fibrinógeno permite la formación de fibrina. La estabilización y fijación del coágulo ocurre en 5-10 minutos.

El restablecimiento de la situación hemostática normal ocurre en 48-72 horas; este proceso incluye la fibrinólisis (ver capítulo 14) que corresponde a la destrucción enzimática de la red de fibrina.

A continuación se describirán las funciones del endotelio y las plaquetas en condiciones normales y luego se detallarán los procesos que se ponen en marcha en la hemostasia primaria y en la que ambos componentes son fundamentales.

2. ENDOTELIO

2.1 Estructura, funciones y heterogeneidad endotelial

Las células endoteliales (CE) forman el revestimiento de todos los vasos sanguíneos y linfáticos dentro del árbol vascular. El cuerpo humano adulto contiene al menos un billón de células endoteliales, que pesan más de 1000 g, cubriendo una superficie de más de 3000 metros cuadrados. Por lo tanto, constituyen un órgano distribuido espacialmente que forma una interfaz dinámica con todos los demás órganos del cuerpo. Es de suma importancia recalcar que no es solo una barrera entre la sangre y tejidos. Por el contrario es fundamental en un conjunto de procesos que van desde la fluidez de la sangre, el equilibrio hemostático y tono vasomotor, la regulación del tráfico de leucocitos, la inmunidad innata y adquirida, y la promoción de la angiogénesis.

Debido a las diferencias en la morfología, expresión génica, composición antigénica y factores vasomotores y al entorno y los estímulos locales, el endotelio muestra una enorme heterogeneidad en diferentes lechos vasculares. Además de explicar las distintas tendencias trombóticas, esta diversidad es necesaria para satisfacer las demandas vasculares y hemostáticas locales.

2.2 Rol del endotelio indemne en la hemostasia

Las células endoteliales normales expresan múltiples factores que inhiben las actividades protrombóticas de plaquetas y factores de la coagulación, y potencian la fibrinólisis. Estos factores actúan conjuntamente para prevenir la trombosis y limitar la coagulación a las zonas de lesión vascular. No obstante, si resultan dañadas o expuestas a factores proinflamatorios, las células endoteliales pierden muchas de sus propiedades antitrombóticas. En los párrafos siguientes se repasaran las propiedades fisiológicas del endotelio, centrándose en el carácter vasodilatador y antitrombótico del endotelio normofuncionante.

2.2.1 Regulación del tono vasomotor

El endotelio tiene funciones endocrinas y paracrinas estratégicas, y libera varias hormonas vasoactivas, incluida la endotelina 1 (ET-1), óxido nítrico (ON) y prostaciclina. El tono vascular se mantiene mediante el equilibrio de las sustancias vasoconstrictoras (ET-1) y vasodilatadoras (ON y prostaciclina) derivadas del endotelio.

El óxido nítrico, un gas derivado de L-arginina, es sintetizado por la enzima ON sintasa. Al ser liberado, el ON se difunde al lado abluminal del vaso para relajar el músculo liso vascular e inhibir la proliferación celular y, en la superficie luminal, causa inhibición de la adhesión y agregación plaquetaria. ON ejecuta

estas funciones activando la guanilato ciclasa en el citosol que a su vez activa la proteína quinasa G, lo que conduce a una reducción intracelular de calcio y una reducción de la activación celular. La prostaciclina, un potente vasodilatador, se produce predominantemente por el endotelio vascular. La prostaciclina inhibe la agregación plaquetaria al aumentar el adenosín monofosfato cíclico (AMPc). Mientras que la prostaciclina es el producto principal de la vía de la ciclooxigenasa en las células endoteliales, el principal producto de esta vía en las plaquetas es el tromboxano. El hecho de que la misma vía produzca dos productos diferentes en diferentes células con efectos fisiológicos opuestos se debe a la expresión de diferentes enzimas corriente abajo. Mientras que la prostaciclina y ON son producidos constitutivamente por las células endoteliales, su síntesis se ve reforzada por la trombina (producida por la activación de coagulación) y adenosín trifosfato (ATP, secretado por la agregación de plaquetas) y por lo tanto se establece una retroalimentación negativa sobre la propagación de formación de trombos.

Las células endoteliales producen ET-1 por una vía constitutiva aunque la síntesis es mínima en vasos sanos. La producción de ET-1 es de un orden que asegura la preservación de la biodisponibilidad de ON; el resultado neto es un vaso "relajado".

2.2.2 Rol como “barrera”

La superficie abluminal del endotelio sirve para asegurarlo a los tejidos subendoteliales a través de uniones mioendoteliales. La superficie luminal, por otro lado, está en contacto con la sangre y está dotado de propiedades tromborresistentes. El endotelio indemne sirve de barrera que impide el contacto de las plaquetas con el colágeno y factor de von Willebrand (FvW) subendoteliales y el contacto de los factores de la coagulación con el factor tisular de la pared de los vasos. La superficie endotelial está revestida por una capa rica en carbohidratos conocida como glicocáliz. Los carbohidratos en esta capa están conectados al endotelio a través de varias moléculas, principalmente proteoglicanos y glicoproteínas. El glicocáliz tiene una carga negativa que repele las células sanguíneas circulantes cargadas de manera similar. Además de su capacidad para restringir la exposición de las células endoteliales al entorno de moléculas circulantes, la capa de células endoteliales también influye en interacciones importantes entre las células sanguíneas y la pared de los vasos. La capa de células endoteliales repele glóbulos rojos y plaquetas del endotelio. Sin embargo, tiene un papel dual en las interacciones entre leucocitos y paredes vasculares. A pesar de expresar las moléculas de adhesión celular, tales como P-selectina, molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM1) y molécula de adhesión celular vascular (VCAM1), la capa de células endoteliales atenúa la adhesión de leucocitos a estas moléculas. Debido al dinámico medio al que está expuesto el endotelio, la composición de la capa de células endoteliales continúa cambiando, reflejando la variación en el contenido de la sangre fluyendo. Esta capa también alberga componentes de los sistemas de coagulación y fibrinolítico y realiza funciones de transportador para oxígeno y otras macromoléculas. Además, la capa de células endoteliales sirve como un transductor mecánico de la tensión física determinada por el flujo de sangre en su superficie.

2.3.3 Síntesis de sustancias antitrombóticas

El endotelio normal también libera varios factores que inhiben la activación y agregación plaquetarias. Estos productos incluyen prostaciclina y ON, los cuales inducen a la relajación del músculo liso vascular y reducen el “shear stress” o fuerza de cizalla cuando se liberan en una dirección abluminal. Cuando se secreta en el torrente sanguíneo, promueven la generación de AMPc plaquetario, inhibiendo así la activación y agregación plaquetaria. Las CE también secretan ADPasa, que degrada el adenosín difosfato (ADP, potente activador de la agregación plaquetaria) extracelular liberado por plaquetas, lo que limita el reclutamiento de plaquetas en el coágulo de plaquetas en crecimiento.

También es de destacar, aunque no sea el objetivo de este capítulo ahondar en la hemostasia secundaria, que el endotelio sintetiza factores que se oponen activamente a la coagulación. Entre los más destacados están la trombomodulina, receptor de proteína C endotelial, moléculas similares a heparina y el inhibidor de la vía del factor tisular. Por último, las células endoteliales normales sintetizan activador tisular del plasminógeno (t-PA), un componente esencial de la vía fibrinolítica.

La secuencia de eventos que se desencadenan con la injuria endotelial serán descritos en el apartado 4.

En el próximo apartado se ahondara en la estructura y función plaquetaria

3. PLAQUETAS

Las plaquetas junto con el endotelio son los participantes esenciales en el proceso de hemostasia primaria, son elementos celulares anucleados de 1.5-3 µm de diámetro, con un volumen de 6-11 fl y en reposo presentan una forma discoide. Se originan por fragmentación del citoplasma de los megacariocitos en la médula ósea, desde donde pasan a la circulación. Con cada megacariocito contribuyendo aproximadamente 1000 plaquetas circulantes en su vida. Las plaquetas se liberan de forma ordenada desde el megacariocito; los megacariocitos tienen un citoesqueleto activo e invaginaciones que forman proplaquetas y luego las liberan en la sangre circulante después de un tiempo de maduración de aproximadamente 4 días. Liberadas a la circulación, sobreviven entre 7 y 10 días, permaneciendo allí alrededor de 8 días antes de ser removidas por el sistema fagocítico mononuclear (SFM). Las plaquetas salen de la circulación presumiblemente a través de una combinación de senescencia y consumo como parte del mantenimiento diario de la integridad estructural vascular. Entre 15.000 y 45.000/mL de las plaquetas salen de la circulación cada día. La mayor parte del recambio plaquetario diario es el resultado de la senescencia y no por el consumo para el mantenimiento de la hemostasia. En condiciones normales, los individuos sanos necesitan pocas plaquetas; aproximadamente 7100 plaquetas/mL se utilizan a diario para la "hemostasia de mantenimiento" cuando las estructuras vasculares no se ven desafiadas por cirugía o trauma reciente y cuando no hay un aumento del consumo sistémico de plaquetas (por ejemplo

en la sepsis). El rango normal de recuento de plaquetas está entre 150.000 y 450.000 /ml.

Estas células circulan normalmente como elementos de forma discoide, y en respuesta a un daño vascular sufren cambios de forma, emiten seudopodios, secretan el contenido de sus gránulos y remodelan su membrana. La principal función de las plaquetas es evitar la pérdida de sangre por adhesión a la pared del vaso dañado e interacción con otras plaquetas, formando la base del tapón hemostático. Este proceso involucra fenómenos de adhesión, secreción y agregación plaquetaria, estrechamente relacionados entre sí. Además, para producir una hemostasia completa, es necesaria la activación del sistema de la coagulación, que da lugar a la generación de trombina y a la transformación de fibrinógeno en fibrina, que estabiliza el tapón hemostático. Las plaquetas activadas también contribuyen a la generación de trombina proporcionando una superficie catalítica donde se ensamblan factores de la coagulación plasmáticos y/o liberados por las propias plaquetas activadas.

Los principales componentes de las plaquetas son la membrana plasmática, los gránulos, el citoesqueleto y los sistemas de membrana internos (canicular abierto y el sistema tubular denso), existen también otras estructuras tales como lisosomas, gránulos de glicógeno y mitocondrias, y ocasionalmente inclusiones de lípidos.

3.1. Membrana plaquetaria

La membrana plasmática de las plaquetas es considerada de importancia crítica en la fisiología de la hemostasia. Posee una serie de receptores funcionales específicos y además durante la agregación y transformación plaquetaria provee de una superficie esencial para la aceleración de la coagulación sanguínea (fosfolípidos de membrana). Media en las interacciones con el medio externo y contiene las estructuras que permiten la transmisión de señales bioquímicas (activadoras o inhibidoras) al interior de la célula. Durante el proceso de secreción, se produce la fusión de las membranas de los gránulos intraplaquetarios con la membrana plasmática a través del sistema canalicular abierto, lo que permite la exposición de antígenos internos en la superficie de la plaqueta. Al igual que las membranas plasmáticas de otras células, la membrana plaquetaria está formada por una doble capa fosfolipídica con una distribución asimétrica que se transforma por la activación celular.

3.1.1 Receptores glicoproteicos

Muchos de los procesos en que participan las plaquetas son mediados por las glicoproteínas (GP) de membrana. Las GP se identificaron, inicialmente, por marcación con radio-isótopos y migración en geles de poliacrilamida-SDS, por lo que su nomenclatura corresponde a las bandas de migración (I, II, III, etc.). En la tabla 12-1 se enumeran las glicoproteínas mayores de la membrana plaquetaria y sus correspondientes ligandos. Varias de ellas pertenecen a la familia de moléculas de adhesión, denominadas integrinas. Las integrinas son heterodímeros

constituidos por dos subunidades α y β que pueden unir uno o más ligandos y participan activamente en los procesos adhesivos y de agregación en las plaquetas. Se les denomina integrinas por su capacidad para conectar actividades biológicas entre la zona externa de la membrana y el citosol.

Tabla 12-1. Glicoproteínas mayores de la membrana plaquetaria

Glicoproteína	Designación CD	Integrina	Ligando	Función
GPIIb-IIIa	CD41-CD61	αIIbβ3	Fibrinógeno, FvW, fibronectina, vitronectina	Agregación
Receptor de vitronectina	CD51-CD61	αvβ3	Vitronectina, FvW fibrinógeno, trombospondina	Adhesión
GPIa-IIa	CD49b-CD29	α2α1	Colágeno	Adhesión
GPIc-IIa	CD49e-CD29	α5β1	Fibronectina	Adhesión
GPIb-IX-V	CD42b,c-CD42a, CD42d		FvW Trombina	Adhesión Agregación
GPIV	CD36		Colágeno, trombospondina	Adhesión Agregación
GPVI			Colágeno	Adhesión
GMP-140 (P-selectina)	CD62P			Interacción plaqueta-leucocito
PECAM-1	CD31			Interacción endotelio

CD, "cluster of differentation"; FvW, factor von Willebrand.

De todos los receptores glicoproteicos queremos profundizar en el conocimiento de GPIIb-IIIa, complejo GPIb-IX-V y P selectina.

GPIIb-IIIa. La GPIIb-IIIA (CD41-CD61) es el receptor plaquetario para el fibrinógeno y otras proteínas adhesivas como el factor von Willebrand (FvW), fibronectina y vitronectina. Es la proteína más abundante de la superficie plaquetaria, constituyendo alrededor del 15% de la masa proteica de la membrana. Las plaquetas en reposo expresan alrededor de 40.000-50.000 copias por célula y existe un compartimento interno asociado a la membrana de los gránulos alfa,

que se expresa en la superficie al activarse las plaquetas. En este complejo glicoproteico, especialmente en la GPIIIa, se encuentra la mayoría de los sistemas antigénicos plaquetarios.

La formación de puentes de fibrinógeno entre receptores GPIIb-IIIa de plaquetas contiguas es requisito indispensable para la formación de agregados plaquetarios y la unión a las demás proteínas adhesivas facilita la adhesión de las plaquetas con el endotelio dañado. Estructuralmente, esta integrina está formada por un dominio extracelular, una secuencia transmembrana y un corto dominio citoplasmático. Esta estructura permite la transmisión bidireccional de señales entre ambas caras de la membrana plaquetaria lo que, como veremos más adelante, tiene importantes implicaciones en la secuencia activación-agregación plaquetaria. Por otra parte, el complejo GPIIbIIIa interviene en la retracción del coágulo, uniendo la red de fibrina extracelular al sistema contráctil en el interior de la plaqueta. La importancia de este receptor se pone de manifiesto en las anomalías clínicas detectadas en la tromboastenia de Glanzman, una enfermedad hemorrágica congénita, que se caracteriza por una falta total o parcial de GPIIbIIIa en los pacientes.

GPIb. La GPIb (CD42b, c) es un heterodímero compuesto de una cadena α (143 kDa) y una cadena β (23 kDa), unidas por puentes disulfuro. En la membrana plaquetaria se encuentra formando complejo con la GPIX (CD42a) y con la GPV (CD42d) (figura 12-3). La GPIb se compone de dos subunidades unidas por puentes disulfuro y pertenece a la familia de las "proteínas ricas en leucina" (LRG). El complejo GPIb-IX-V actúa como receptor para el FvW, interacción esencial en el fenómeno de adhesión de las plaquetas a la pared del vaso dañado y también juega un papel importante en la activación de las plaquetas por la trombina. Existen unas 25.000 copias de GPIb y GPIX y aproximadamente la mitad de GPV por plaqueta. Al contrario de lo que ocurre con GPIIb-IIIa, la activación plaquetaria reduce el nivel de exposición de este complejo en la membrana plaquetaria, ya que se redistribuye en las membranas del sistema canalicular abierto, un proceso mediado por el citoesqueleto plaquetario. Además, la activación de las plaquetas produce la activación de calpaínas, proteasas dependientes de calcio, que degradan el complejo, liberando GPIb y GPV. La degradación por calpaína de GPIb libera un fragmento denominado glicocalicina, que puede detectarse en el plasma normal (1-3 µg/ml) y se encuentra elevado en pacientes con trombocitopenia debida a un aumento de destrucción plaquetaria, lo que se ha utilizado para distinguir de trombocitopenia por defecto de producción plaquetaria.

La unión GPIb-IX-V-FvW se incrementa a flujos sanguíneos elevados, posiblemente debido a un cambio conformacional por el flujo tanto del complejo glicoproteico como del FvW, lo que facilita una unión efectiva entre las plaquetas y el endotelio. También, como se ha visto, GPIb-IX-V contribuye junto a GPIIb-IIIa a la unión plaqueta-plaqueta durante el crecimiento del trombo, en este caso mediado por el FvW liberado por las plaquetas ya adheridas. Otra función importante de GPIb-IX-V es mediar en la activación y secreción plaquetaria inducida por las fuerzas de cizalladura elevadas, como puede suceder en zonas de estenosis.

El complejo GPIb-IX-V tiene también dos lugares específicos de reconocimiento para la trombina en GPIb y GPV. Existe evidencia de que el punto de unión de alta afinidad para la trombina en GPIb facilita la respuesta de las plaquetas a este importante agonista fisiológico, además de las respuestas a la trombina mediadas por los receptores activados por proteasas (PAR). En este sentido, las plaquetas de los pacientes con síndrome de Bernard Soulier que presentan deficiencias en GPIb-IX-V, o el bloqueo con anticuerpos monoclonales anti-GPIb hace que las plaquetas respondan de modo defectuoso a pequeñas concentraciones de trombina. GPIb une también factores del sistema intrínseco de la coagulación, como el kininógeno de alto peso molecular, FXI y FXII. Otra contribución potencialmente importante del complejo GPIb-IX-V es la aceleración de la generación de trombina en la superficie de plaquetas activadas, ya que la trombina unida a GPIb incrementa la exposición de fosfolípidos procoagulantes de las plaquetas.

Finalmente, la interacción de GPIb-IX-V con la trombina y con el FvW, que a su vez facilita la interacción plaqueta-colágeno inicia la compleja secuencia de transmisión de señales que da lugar a la reorganización del citoesqueleto, el aumento del calcio citosólico y la activación del receptor GPIIb-IIIa.

P-selectina. La P-selectina (CD62P) es una glicoproteína perteneciente a la familia de las selectinas, presente en los gránulos alfa y que se expresa en la superficie de las plaquetas activadas. También se encuentra en los gránulos Weibel-Palade de las células endoteliales. La función principal de esta GP es mediar la interacción entre plaquetas y leucocitos mediante la unión de la P-selectina expuesta en las plaquetas y su receptor, la P-selectina glicoproteína-1 (PSGL-1) en los leucocitos. La unión leucocito-plaqueta se refuerza además mediante la unión GPIIb-IIIa en las plaquetas y el receptor CD11-CD18 (Mac-1) en leucocitos mediante puentes de fibrinógeno. Recientemente se ha comprobado que la P-selectina puede unirse también a GPIb en las plaquetas y que las plaquetas también poseen PSGLP-1, lo que permite la interacción plaqueta-endotelio mediado por P-selectina endotelial, así como la participación de estos ligandos en la estabilización de los agregados plaquetarios. Adicionalmente, la unión de P-selectina a los monocitos induce en los mismos la expresión de factor tisular y promueve la formación de fibrina.

3.1.2. Receptores no glicoproteicos

Entre los receptores no glicoproteicos más importantes están los receptores de: ADP, trombina, TXA2, serotonina y receptores adrenérgicos. Desde un punto de vista funcional, a los receptores no glicoproteicos se les puede clasificar en: receptores activadores (como: ADP, epinefrina, serotonina, PAF, trombina, TXA2), receptores inhibidores (como: prostaciclina, prostaglandina D2 y E1, adenosina) y receptores de fármacos.

El mecanismo general involucrado de la transducción de la señal lo podemos resumir de la siguiente manera. Cuando un agonista se une a un receptor se inicia una secuencia de eventos, donde la señal biológica es traslocada a un efector

celular específico. Después de la interacción de un agonista con receptores asociado a proteína G (o receptores de siete dominios hidrofóbicos), la señalización se inicia con la activación de proteínas heterotriméricas que unen proteína G, las que están íntimamente asociadas con el receptor. La señal es posteriormente propagada a través de la disociación en una subunidad Gα y un dímero Gβγ, y cada uno de los cuales puede activar moléculas efectoras específicas como por ejemplo: adenilato ciclasa, fosfolipasa C (PLC), canales iónicos, etc. A pesar que distintos receptores asociados a proteína G parecen funcionar a través de diferentes vías de transducción de la señal, es también evidente que en ciertos puntos, a través de la cascada de activación, estas vías pueden comunicarse. Es así que, la interacción de un agonista con un receptor puede influir la respuesta celular de otro agonista independiente que interacciona con un receptor distinto. Este fenómeno de intercomunicación entre vías, es el fenómeno de sinergismo, en el cual la respuesta causada por dos agonistas juntos es mayor que la suma aritmética de sus respuestas individuales.

3.2. Gránulos plaquetarios

Las plaquetas contienen un número variable de gránulos, morfológicamente diferentes cuando se observan al microscopio electrónico. Los gránulos que presentan las plaquetas son los gránulos alfa, los densos y los lisosomas.

Gránulos alfa

Los gránulos alfa son los gránulos más abundantes de las plaquetas y tienen un diámetro entre 200-400 nm; cada plaqueta presenta de 35 a 40 gránulos α, constituyendo el 15 % del volumen total de las plaquetas. Estos almacenan un número importante de proteínas, la mayoría proveniente del plasma, algunas de las cuales juegan un importante rol en la hemostasia primaria, como el fibrinógeno. Otras proteínas son específicas de linaje, como el factor plaquetario 4 y β-tromboglobulina (tabla 12-2).

Algunas de las proteínas contenidas en estos gránulos pueden también proveer un grado adicional de regulación del balance entre la formación del coágulo y su disolución. Otras proteínas de los gránulos alfa son los factores de crecimiento o componentes de la matriz extracelular.

Una deficiencia congénita de los gránulos alfa se llama síndrome de las plaquetas grises.

Tabla 12-2. Contenido de los gránulos plaquetarios

Contenido de los gránulos
Alfa Proteínas específicas (PF4, β-tromboglobulina,αIIbβ3); proteínas adhesivas (fibrinógeno, FvW, fibronectina, trombospondina, vitronectina, P-selectina); proteínas del sistema hemostático (factor V, FVIII, FXI, proteína S, kininógeno de alto peso molecular, plasminógeno, t-PA, inhibidor-1 activador del plasminógeno, α-2 antiplasmina, α-2 macroglobulina, α-1 antitripsina, GAS6); factores de Crecimiento (PDGF, EGF, TGFβ) Otros: Albúmina, IgG, IgA osteonectina
Densos ADP, ATP, GTP, GDP, Ca^{2+}, Mg^{2+}, 5 HT, fosfato
Lisosomas Proteasas (elastasa, colagenasa, proteasas neutras); fosfatasas/sulfatasas (αglicerol fosfatasa, arilfosfatasa, arilsulfatasa); glucosidasas (β-hexosaminidasa, β-glucoronidasa, heparinitasa)

PF4, Factor plaquetario 4. t-PA, Activador Tisular del Plasminógeno. GAS6-Growth arrest – specific 6.PDGF, Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas; EGF, Factor de Crecimiento Epidérmico. TGFβ -Factor de crecimiento transformante β. GTP- guanosín trifosfato. GDP- guanosín difosfato. 5 HT-serotonina.

Gránulos densos

Los gránulos densos (tabla 12-2) se caracterizan por su alta densidad electrónica que le confiere el elevado contenido de calcio y fósforo inorgánico (50% del total). El calcio forma un complejo macromolecular con la serotonina (5 hidroxitriptamina, 5-HT) y nucleótidos de adenosina (ATP, ADP) Los gránulos densos contienen el 60% de los nucleótidos de adenina de las plaquetas, el resto, fundamentalmente ATP, es metabólico y se emplea en las funciones celulares. La liberación del contenido de los gránulos densos, particularmente del ADP y 5-HT juega un papel importante en la amplificación de la respuesta plaquetaria al estímulo y en el crecimiento del trombo.

Lisosomas

Son estructuras citosólicas similares a los gránulos de pequeño tamaño 175-200 nm, contienen proteasas, fosfatasas, sulfatasas y ectoglucosidasas. Su función está relacionada con la destrucción intracelular de partículas extrañas. Su contenido se libera al exterior por una fuerte estimulación de las plaquetas y se ha detectado la exposición de proteínas lisosómicas en la membrana de las plaquetas activadas como la CD63, que se utiliza como un marcador de fuerte activación plaquetaria. La liberación de su contenido como proteasas como la

elastasa o la colagenasa en la proximidad del vaso sanguíneo afectado, contribuye al daño endotelial.

3.3. Citoesqueleto plaquetario

El citoesqueleto plaquetario es el responsable de mantener la estabilidad de la membrana, su forma discoide y las modificaciones morfológicas que estas experimentan cuando son activadas. Otra función importante del citoesqueleto es servir de punto de unión de moléculas de señalización que se traslocan desde el citosol, formando complejos multimoleculares de señalización. De este modo, el citoesqueleto regula la organización espacial de la célula y la integración de mecanismos bioquímicos que conducen a las respuestas celulares.

Las plaquetas son particularmente ricas en proteínas contráctiles, representando alrededor del 50% del total de las proteínas plaquetarias. Varias respuestas plaquetarias incluyendo secreción, cambio de forma, agregación y retracción del coágulo, requieren la fuerza generada por proteínas contráctiles. Entre ellas se encuentran la actina, profilina, gelsolina, tropomiosina, caldesmón, proteína de unión a actina, talina, vinculina, miosina, kinasa de cadena liviana de miosina, calmodulina.

El citoesqueleto de las plaquetas contiene dos componentes estructurales basados en filamentos de actina: (a) filamentos de actina que se encuentran en el citoplasma y median fenómenos de contracción y (b) el citoesqueleto submembranoso, unido a la membrana citoplasmática y que regula su forma y estabilidad. En plaquetas en reposo, solo el 30-40% de la actina está polimerizada en filamentos.

3.4. Sistemas de membrana internos: canicular abierto y tubular denso

Las plaquetas tienen dos sistemas de membrana internos, el sistema canicular abierto y el sistema tubular denso.

El sistema canicular abierto, a menudo llamado sistema canicular conectado a la superficie, está formado por invaginaciones de la membrana plasmática (estructura única con 15-20 aberturas), el cual interconecta con otros sistemas, al igual que el sistema tubular denso. El sistema canicular abierto juega un papel importante en la fisiología de las plaquetas humanas, aumentando la superficie total de contacto, permite el intercambio de sustancias en profundidad, como también ofrece un sitio para la salida del contenido de los gránulos alfa y una ruta para la incorporación de material soluble y particulado desde el medio que las rodea *in vivo*, el plasma.

El sistema tubular denso; está constituido por canales delgados internos con un contenido amorfo que aparece cerca de los microtúbulos y rodea a los organelos. Tiene funciones similares a las del retículo endoplásmico liso de otras células. Es un regulador de la activación plaquetaria mediante la liberación o secuestro de calcio iónico, del cual es su principal depósito. También contiene enzimas oxidativas y enzimas del metabolismo de prostaglandinas.

4. FORMACIÓN DEL TROMBO PLAQUETARIO

Una vez descritos las características generales del endotelio y plaquetas en los apartados anteriores, se pasará a describir la secuencia de hechos que llevan a la formación del trombo plaquetario. En respuesta a un daño vascular las plaquetas, que normalmente circulan como células aisladas, se encuentran con el entorno trombogénico de la matriz subendotelial. Esto inicia interacciones entre las proteínas adhesivas de la pared como el FvW y los correspondientes receptores en la membrana plaquetaria. Esta etapa adhesiva facilita, a su vez, la interacción de las plaquetas con el colágeno y el inicio de la etapa de activación. Posteriormente se genera trombina, que es también un fuerte inductor de activación plaquetaria. La activación produce cambios estructurales en la membrana, y cambios de forma con emisión de pseudópodos si están circulantes. También se inicia una secuencia de procesos bioquímicos, que propician la agregación y la liberación al medio extracelular de productos granulares y productos metabólicos liberables como el TXA2. Algunas de estas sustancias liberadas por las plaquetas (ADP, serotonina, TXA2) son también estímulos plaquetarios que refuerzan la activación y la agregación, y promueven el reclutamiento de nuevas células al trombo en formación. Finalmente, las plaquetas activadas desarrollan una actividad procoagulante que favorece la formación de fibrina y la consolidación del trombo. En condiciones normales estos mecanismos controlan la hemorragia. Sin embargo, en condiciones patológicas los mecanismos de control pueden fallar, produciendo trombosis o diátesis hemorrágica.

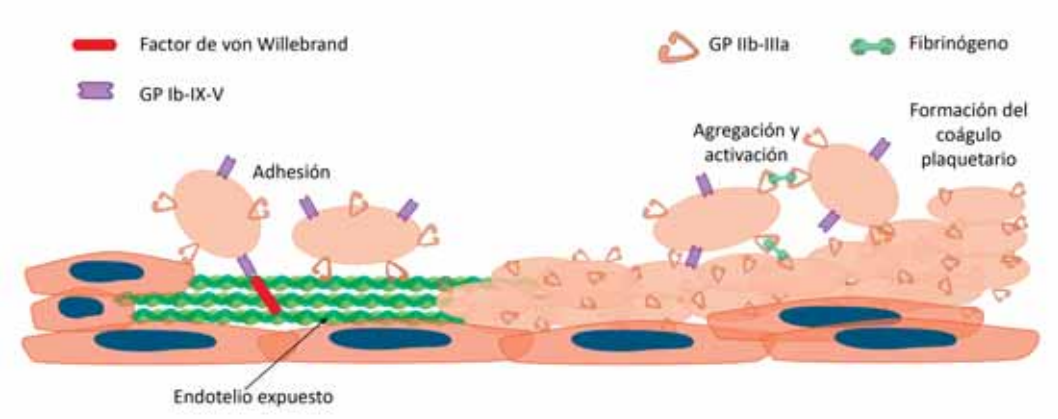


Figura 12-1 - Secuencia de formación del trombo plaquetario.

Se quiere marcar el rol levemente diferente de las plaquetas en la hemostasia a nivel arterial y venoso. En la circulación arterial son las primeras en responder a las rupturas en la integridad vascular, adhiriéndose al FvW expuesto, reclutando plaquetas circulantes para formar un tapón plaquetario y liberar sustancias vasoconstrictoras para reducir la pérdida de sangre. El factor XIII y factor plaquetario 4, ambos liberados de los gránulos plaquetarios durante la activación, protegen al coágulo naciente de la fibrinólisis. Por el contrario, en la circulación venosa, el papel de las plaquetas es más auxiliar, proporcionando una superficie

repleta de receptores para factores de coagulación y una fuente de fosfolípidos cargados negativamente para optimizar la cinética de la cascada de coagulación soluble. Ligandos adhesivos y factores de crecimiento, liberados de los gránulos de plaquetas, promueven la consolidación del coágulo y curación de heridas, respectivamente.

4.1 Injuria endotelial y fenómenos vasculares

La injuria endotelial puede ser causada por lesiones traumáticas, patógenos microbianos, fuerzas hemodinámicas o mediadores proinflamatorios. El primer proceso que desencadena esta injuria es la vasoconstricción arteriolar y la reducción del flujo sanguíneo del área afectada. La vasoconstricción mediada por mecanismos neurogénicos reflejos, puede ser potenciada por la secreción local de factores como la ET-1, potente vasoconstrictor derivado del endotelio. Las células endoteliales producen ET-1 por una vía constitutiva aunque la síntesis es mínima en vasos sanos como se nombró previamente. No obstante, la disfunción y el daño endotelial conducen a una sobreproducción de ET-1 por las células endoteliales, células de músculo liso vascular y macrófagos. Esto a su vez, regula a la baja la producción de ON sintasa en las células endoteliales, resultando en la supresión de la producción de ON, cambiando así el equilibrio hacia la vasoconstricción. Al mismo tiempo, el ON se sabe que tiene un potente efecto inhibidor sobre la liberación de ET-1 de las células endoteliales y los dos parecen establecer una mutua regulación a través de un circuito de retroalimentación autocrina. El resultado neto del desequilibrio ET-1 / ON favorece la creación de un medio trombótico que es fundamental para la patogenia de diversas vasculopatías.

No obstante la vasoconstricción es transitoria y la hemorragia se reanudaría de no ser por la activación de plaquetas y factores de la coagulación.

4.2. Adhesión y extensión de las plaquetas

El proceso de adhesión comprende el transporte de las plaquetas hacia la superficie reactiva y la interacción de los receptores de la membrana plaquetaria con sus ligandos en las estructuras de la pared lesionada. Entre las proteínas adhesivas de la matriz se incluyen: colágeno, fibronectina, FvW, laminina, vitronectina y trombospondina. Varias glicoproteínas de membrana plaquetaria y sus ligandos extracelulares (tabla 12-1) pueden mediar la adhesión plaquetaria al endotelio lesionado.

Las plaquetas no se adhieren a las células vasculares endoteliales normales, pero en áreas de lesión endotelial sí lo hacen a varios componentes del tejido conectivo subendotelial. En los segundos siguientes a la lesión, las plaquetas se adhieren y se activan con el colágeno del subendotelio vascular a través de la GPIa-IIa y GPVI. Esta interacción es estabilizada por la interacción entre el FvW inmovilizado en la superficie del endotelio o en la matriz subendotelial con su receptor plaquetario, el complejo glicoproteína Ib-IX-V. La subunidad de unión al ligando del complejo receptor GPIb-IX-V, GPIb, contiene sitios de unión para el

dominio A1 del FvW en su dominio terminal NH2. El FvW y la GPIb responden al aumento de la fuerza de cizalla al experimentar cambios conformacionales que aumentan su afinidad entre sí, formando "uniones de captura" resistentes al cizallamiento o "uniones flexibles" que permiten la adhesión de las plaquetas bajo fuerzas de cizalla. El dominio citoplásmico de GPIb está anclado a los filamentos de actina, que subyacen a la membrana plasmática plaquetaria, a través de la interacción con filamina A. Esta interacción es crítica para mantener la estructura de la membrana y la forma plaquetaria, y también es un refuerzo estructural importante para resistir la fuerza de cizalla durante la adhesión de las plaquetas. A pesar de su capacidad para resistir el cizallamiento, la adhesión de plaquetas al FvW mediada por GPIb-IX es de naturaleza transitoria. La adhesión estable de plaquetas iniciada por la unión FvW/GPIb-IX requiere la activación de otro receptor de FvW, la integrina αIIbβ3.El FvW también tiene dominios de unión para el colágeno subendotelial. La adhesión y activación de las plaquetas por el colágeno induce la activación del complejo GPIIb-IIIa que también participa en la adhesión plaquetaria, sobre todo en condiciones de alta velocidad de cizalla local, uniéndose al factor FvW. Una vez adheridas al subendotelio, las plaquetas se extienden sobre la superficie y luego se unen a otras plaquetas.

Fuerza de cizalla

La fuerza mecánica más relevante en la hemostasia es la fuerza de cizalla. El término "shear" tiene el significado de movimiento deslizante entre dos planos adyacentes, mientras el concepto "stress" denota fuerza por unidad de área. La sangre es un fluido viscoso con flujo laminar, el que se entiende por el tipo de movimiento en el que el fluido se mueve como una serie de láminas individuales, con cada estrato moviéndose a una velocidad diferente de sus láminas vecinas. La fuerza de cizalla, por tanto, se define como la fuerza de unidad por área entre láminas, expresándose en dinas/cm^2. El valor de esta fuerza de cizalla local es cero en el centro del vaso y máximo en la periferia, donde tienden a estar las plaquetas.

La fuerza de cizalla en venas es de menos de 2 dinas/cm^2, en arterias es de 20-30 dinas/cm^2 y en arterias estenosadas pueden ser mayor a 200 dinas/cm^2.

La agregación plaquetaria en respuesta a valores elevados de "shear stress" depende, como se nombró en párrafos anteriores de la presencia del FvW plasmático y los complejos receptores GPIb-IX-V y GPIIb-IIIa. El FvW es una proteína plasmática multimérica, que tiene sitios de unión para dichos receptores plaquetarios y para constituyentes del subendotelio (colágeno tipo I, III y VI). Se quiere destacar el rol que cumple el factor de von Willebrand en la hemostasia primaria y secundaria. El FvW funciona como una molécula adhesiva entre las plaquetas y el subendotelio, y entre las plaquetas adyacentes, que conduce a la agregación plaquetaria en el sitio de lesión endotelial. Junto con los megacariocitos, el endotelio es el sitio principal de producción del FvW. El FvW se almacena en los cuerpos de Weibel–Palade en las células endoteliales y se libera cuando los cuerpos de Weibel Palade experimentan exocitosis en respuesta a varios estímulos. El FvW también sirve como proteína transportadora del factor

VIII (FVIII) que tiene una vida media muy corta si esta unión es afectada debido tanto a una reducción en la cantidad de FvW o a través de mutaciones en el gen FvW que afecten la unión del sitio.

La unión del FvW con el complejo GPIb-IX-V es fundamental para la adhesión y agregación. La unión de la GPIIb-IIIa al FvW en condiciones estáticas es mínima, pero en plaquetas bajo el efecto de la fuerza de cizalla la interacción presenta la misma intensidad que con la GPIb-IX-V. Estos complejos glicoproteicos tienen sitios de unión para el FvW inducibles por la fuerza de cizalla. Solo una minoría de las plaquetas une al FvW y la unión es reversible y no saturable. También se ha observado que los multímeros más grandes de FvW promueven una agregación más efectiva y que el efecto de la fuerza de cizalla en la formación del trombo plaquetario en el complejo in vivo es potenciado por agonistas químicos. Esta puede ser la razón por la que los infartos pueden ocurrir en pacientes con un grado relativamente bajo de estenosis, el efecto de la fuerza de cizalla es sobre los receptores plaquetarios, más que sobre el FvW mismo.

En cuanto a la inhibición de estos procesos plaquetarios activados por la fuerza de cizalla, se ha visto que el AMPc o el GMPc a altas concentraciones, inhiben la adhesión y la agregación. La aspirina tiene un pequeño efecto en inhibir la agregación inducida por la fuerza de cizalla. Agentes fibrinolíticos inhiben la respuesta plaquetaria a la fuerza de cizalla, debido a la proteólisis del FvW por la plasmina y t-PA.

El mecanismo exacto por el cual la fuerza de cizalla induce agregación plaquetaria no se conoce. Se ha observado una elevación del Ca^{+2} citoplasmático. Los multímeros de FvW interactúan con la GPIbα, causando aumento de calcio y la agregación plaquetaria, efectos que serían potenciados por la unión del FvW al complejo activado GPIIb-IIIa en presencia de ADP liberado por las plaquetas activadas. Se sabe que la participación de una compleja red de señales intracelulares, en que participan diversas proteínas kinasas e interacciones entre las proteínas de membrana plaquetaria con el citoesqueleto.

La fuerza de cizalla, además de actuar sobre las plaquetas, también provoca en las células endoteliales la secreción de prostaciclina, la cual tiene acción vasodilatadora e inhibe la agregación plaquetaria. También secreta ON, un potente vasodilatador e inhibidor de la adhesión y agregación plaquetaria.

El recuento de las plaquetas y la fuerza de cizalla están directamente relacionadas con la frecuencia de colisión (número de contactos plaqueta-plaqueta por unidad de tiempo) y eficiencia de colisión (colisiones plaquetarias que resultan en adhesión o agregación), promoviendo por tanto la agregación plaquetaria.

En contraposición con todo lo dicho, en la circulación sanguínea, la fuerza de cizalla elevada (debido al flujo sanguíneo rápido), tiende en parte a diluir las moléculas procoagulantes y previenen la formación de fibrina insoluble. El fenómeno trombogénico es multifactorial y hay mayor propensión a que ocurra cuando el flujo sanguíneo es lento (esto cobra relevancia sobre todo en el torrente venoso).

Como se ha indicado, las plaquetas no se adhieren a una capa de células endoteliales intactas, aunque estén sujetas a una elevada fuerza de cizalla, pero sí lo hacen fuertemente a un subendotelio expuesto. Se han estudiado diversas moléculas del subendotelio para intentar definir qué molécula es la más importante en mediar la adhesión bajo el efecto de la fuerza de cizalla: (i) El **colágeno** fibrilar tipo I y III está presente en altas concentraciones en arterias y ambos unen FvW. Los monómeros de FvW muestran dos sitios de unión para estos tipos de colágeno, de los cuales solo uno es relevante. El tipo VI también une este factor, pero está en menor cantidad en sector arterial. Este tipo de colágeno no responde a la fuerza de cizalla elevada, pero sí a baja fuerza de cizalla, uniéndose así a las plaquetas; este hecho sugiere que el colágeno tipo VI media la adhesión plaquetaria en vénulas y capilares, donde la fuerza de cizalla es menor; (ii) El **FvW** subendotelial, derivado de células endoteliales, puede ser más activo que el FvW plasmático en la iniciación de la adhesión a flujo lento, pero por sí solo no promueve la adhesión plaquetaria en ausencia de fuerza de cizalla; sin embargo, en compañía de otros componentes, baja el nivel del umbral de esta fuerza para que se produzca la adhesión; (iii) El **fibrinógeno** también se encuentra en la superficie del endotelio vascular y junto a la fibrina en placas ateroscleróticas. La fibrina también une a las plaquetas y se ha visto que en fuerzas de cizalla elevadas la formación de trombo plaquetario sobre la fibrina es relativamente más dependiente de FvW y GPIbα, mientras que en niveles más bajos es relativamente más dependiente de GPIIb-IIIa; (iv) Otras moléculas implicadas en la adhesión y que interactuarían con las glicoproteínas plaquetarias son laminina, trombospondina, fibulina-1 y fibronectina. La fibulina-1, es una proteína que puede asociarse a otros constituyentes de la matriz como la laminina y la fibronectina y también al fibrinógeno; favorece la adhesión mediante formación de puentes de fibrinógeno con las plaquetas. La fibronectina media la adhesión plaquetaria a través de su unión a GPIc-IIa y GPIIb-IIIa en las plaquetas. La trombospondina se piensa que se une a CD36.

4.3. Agregación plaquetaria.

La agregación plaquetaria es el proceso de unión de las plaquetas entre sí para formar el trombo. Entre los agonistas plaquetarios que se han estudiado *in vitro*, los que tienen mayor relevancia fisiológica parecen ser la trombina, el ADP, la adrenalina, el colágeno, y el ácido araquidónico. En la tabla 12-3 se muestran los agonistas, clasificados según su capacidad de activación plaquetaria. Como agonistas fuertes se consideran los que pueden inducir la secreción con independencia de la agregación, y a altas concentraciones, de modo independiente a la síntesis de tromboxano. En cambio los agonistas débiles requieren agregación y síntesis de tromboxano para una respuesta completa.

Si la activación se realiza en plaquetas en suspensión, la primera respuesta morfológica al inductor es su cambio de forma, de disco a esfera con emisión de pseudópodos. Desde el punto de vista bioquímico, es necesario el cambio conformacional del receptor GPIIb-IIIa a la forma adhesiva, capaz de unir fibrinógeno y formar puentes entre plaquetas físicamente próximas para producir agregación plaquetaria con cualquier inductor. La unión del fibrinógeno, a su

vez, refuerza la activación plaquetaria, y favorece la secuencia bioquímica que lleva a la secreción y la síntesis de TXA2.

Tabla 12-3. Agonistas más comunes que inducen respuesta plaquetaria

Fuerza del estímulo	Agonista
Débil	ADP, adrenalina, colágeno (dosis baja), vasopresina, Serotonina, PAF
Intermedia	TXA2
Fuerte	Trombina, colágeno (dosis alta), ionóforo A23187

PAF, "Platelet activating factor"

4.4. Secreción y reclutamiento

La reacción de liberación consiste en la extrusión de los gránulos citoplasmáticos y su contenido al medio extracelular. La secreción de los gránulos alfa requiere una menor estimulación que la de los gránulos densos o lisosomas. Este proceso es dependiente del calcio citosólico. Morfológicamente, en una primera etapa, se produce la centralización de los gránulos y posteriormente una fusión de los mismos con la membrana del sistema canalicular abierto y la ulterior salida a través de los poros que comunican este sistema con el exterior.

La secreción tiene una gran importancia funcional ya que amplifica la respuesta activante del estímulo inicial en las plaquetas secretoras. Adicionalmente, los productos secretados de las plaquetas activadas son un agonista fisiológico complejo que promueve la activación de otras plaquetas induciendo el reclutamiento, una etapa esencial en el crecimiento del trombo. Estudios recientes indican que tanto la secreción plaquetaria como la actividad reclutadora de los productos liberados de las plaquetas activadas se modulan por su interacción con otras células sanguíneas. La interacción leucocito-plaqueta inhibe, mientras que la interacción eritrocito-plaqueta incrementa la reactividad plaquetaria. Estos son procesos regulados bioquímicamente y que modifican el efecto de algunos fármacos antitrombóticos, especialmente de la aspirina.

Por otra parte, las sustancias liberadas o expuestas en la membrana de las plaquetas activadas participan en las interacciones de las plaquetas con las restantes células sanguíneas y el endotelio.

5. SECUENCIA BIOQUÍMICA DE LA ACTIVACIÓN PLAQUETARIA

La activación plaquetaria es un proceso modulado dinámicamente por señales activadoras e inhibidoras a las que se encuentra expuesta la superficie de la célula. Como se ha mencionado, entre los agonistas plaquetarios se incluyen macromoléculas de la matriz subendotelial (colágeno, FvW) hormonas circulantes (adrenalina, vasopresina), sustancias generadas en la lesión vascular como trombina, sustancias liberadas por las plaquetas activadas (ADP, TXA2, serotonina) o generadas por otras células. Las sustancias inhibidoras más relevantes son la prostaciclina, y las ecto-ADP-asas de membrana, que ejercen una función tromborreguladora. Igualmente se quiere destacar que aunque clásicamente se ha reconocido a la vía del ON - GMPc como un regulador negativo de la activación plaquetaria, de hecho juega funciones bifásicas en la activación plaquetaria y es importante en la mediación de la activación plaquetaria inducida por varias vías de señalización del receptor, incluyendo las vías de señalización mediadas por receptor de reconocimiento de patrones plaquetarios.

Las plaquetas poseen diversos mecanismos y estrategias por los que los estímulos extracelulares se transmiten al interior de la célula, lo que resulta en la respuesta funcional apropiada. Esto se lleva a cabo con la participación de distintos mecanismos complejos y altamente coordinados de transmisión de señales, aún no bien caracterizados. La señalización de activación plaquetaria se puede dividir en las siguientes fases: a) señalización temprana divergente del receptor inducida por no solo agonistas plaquetarios solubles clásicos, sino también por ligandos de receptores de adhesión y estímulos inflamatorios; b) convergencia de vías de señalización temprana en intermediarios comunes y redes de amplificación de señales; c) señalización de adentro hacia afuera ("inside- out") que conduce a la activación del principal receptor de adhesión plaquetaria, la integrina αIIbβ3, que media la adhesión y agregación plaquetarias estables; y d) señalización de integrina de afuera hacia adentro ("outside-in"), que amplifica en gran medida la activación plaquetaria y el tamaño del trombo.

5.1 Vías de señalización que conducen a la activación plaquetaria

5.1.1 Señalización de activación plaquetaria mediada por receptores de adhesión

Señalización GPIb-IX.

Como ya se dijo, la unión de FvW a GPIb-IX bajo fuerzas de cizalla desencadena señales de activación de plaquetas, lo que lleva a la activación de la integrina αIIbβ3 y a la adhesión plaquetaria estable dependiente de la integrina.

GPIb-IX también se une a la trombina y es importante para la activación plaquetaria inducida por trombina en dosis bajas.

La señalización de GPIb-IX inducida por FvW o trombina, requieren la unión de 14-3-3ζ al dominio citoplásmico de GPIb, una vía de señalización de la quinasa

de la familia Src-Rac1 y la activación aguas abajo de las vías de la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) -Akt, de la vía de la proteína quinasa dependiente de GMPc (PKG), de la vía de la de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAP) o quinasa activada por señalización extracelular (ERK1/2 y p38) y de vía de la quinasa LIM 1 (LIMK1). El papel que juega LIMK1 en la estimulación del FvW y la activación plaquetaria inducida por trombina en dosis bajas es específica para la vía de señalización de GPIb-IX, porque LIMK1 parece jugar un papel negativo en activación plaquetaria inducida por los agonistas plaquetarios independientes de GPIb-IX.

Señalización de ITAM (inmunorreceptor con motivo de activación basado en tirosina)

ITAM es un motivo de secuencia de proteínas en el dominio citoplasmático de ciertos inmunorreceptores que contienen dos residuos de tirosina dentro de una secuencia conservada. El papel de ITAM se ejemplifica mejor en el receptor de colágeno GPVI, que desempeña un papel fundamental como activador plaquetario robusto inducido por colágeno.

GPVI forma un complejo no covalente con el receptor y, según se informa, está asociado con ciertas quinasas asociadas con Src, a través del dominio intracelular rico en prolina de GPVI. Este complejo es necesario para transmitir señales inducidas mediante la unión del colágeno a los dominios extracelulares de tipo inmunoglobulina de GPVI.

Tras la agrupación de GPVI inducida por colágeno, el ITAM asociado al receptor de Fc es fosforilado en tirosina por quinasas asociadas a Src.

La fosforilación de tirosina de ITAM permite la unión de la tirosina quinasa Syk, permitiendo su activación. La activación de Syk, inicia una cascada de eventos que involucran moléculas adaptadoras y quinasas, que conduce a la translocación de la PLC2 a la membrana plasmática y a su fosforilación y activación. La PLC2 hidroliza el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) en 1,2-diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP3). DAG e IP3 activan la proteína quinasa C y liberan calcio en el citosol de las reservas intracelulares, respectivamente, promoviendo producción de tromboxano y secreción de gránulos, señalización de adentro hacia afuera (“inside-out”) y activación de integrinas.

También se informa que GPIb-IX y la integrina αIIbβ3 están asociados con los receptores ITAM. Sin embargo, parece que su principal señalización no requiere la vía de señalización ITAM. Por otra parte, la señalización ITAM jugaría un papel importante en la amplificación de la señalización iniciada por estos receptores, lo que lleva a mayores respuestas plaquetarias.

5.1.2 Señalización de activación plaquetaria mediada por receptores de reconocimiento de patrón

Los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) son moléculas, como ADN, ARN, glicoproteínas, y lipopolisacáridos (LPS), producidos por microorganismos. Los patrones moleculares asociados a daño (DAMP) son moléculas liberadas en respuesta a daño al tejido. Se conoce a PAMP y DAMP como receptores de reconocimiento de patrones, y son ejemplos de estos grupos: receptores de reconocimiento de patrones, como receptores Toll-like, receptor similar al dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD) y el receptor de productos finales de glicación avanzada (RAGE), y sirven como señales de inicio para la inmunidad innata y respuestas inflamatorias no infecciosas. Se ha mostrado recientemente que TLR y NO promueven la activación plaquetaria. Las plaquetas expresan varios TLR, incluidos TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, y TLR9. Se ha demostrado que TLR2 es crítico para la activación plaquetaria inducida por un agonista sintético específico de TLR1 / TLR2 y por derivados de lípidos oxidados. TLR9 media señales de activación plaquetaria inducidas por aductos de carboxi-proteína generados durante el estrés oxidativo. TLR4 es un receptor plaquetario importante para LPS y media las señales que conducen a las plaquetas a la secreción de gránulos en respuesta a LPS, y también media la activación y secreción plaquetaria inducida por HMGB1, una proteína de unión al ADN, que es liberada por monocitos y macrófagos durante la inflamación y también se almacena en gránulos de plaquetas y se libera durante la activación plaquetaria. La señalización de TLR2, TLR4 y TLR9 en plaquetas depende de MyD88. Los datos publicados por diferentes grupos han demostrado que TLR4 media la señalización de la activación plaquetaria por la activación dependiente de la vía cGMP-PKG por MyD88.

Es probable que la activación plaquetaria inducida por receptores de reconocimiento de patrones sirva como mecanismo para la respuesta trombótica a la infección microbiana y daño tisular en paralelo a la inmunidad innata e inflamación. Por otro lado, el almacenamiento plaquetario de DAMP y su liberación durante la activación plaquetaria es probable que aumente la inflamación. Además de los receptores de reconocimiento de patrones, ciertas especies de lípidos oxidados pueden estimular a las plaquetas a través de la glicoproteína IV, que involucra a la vía de señalización de la quinasa MAP. La activación de plaquetas durante la respuesta inmunitaria e inflamatoria también puede ser estimulada por otros estímulos trombóticos e inflamatorios, como los complejos antígeno-anticuerpo, trombina o factor activador de plaquetas a través de vías acopladas a proteína G.

5.1.3 Señalización de activación plaquetaria inducida por agonistas plaquetarios solubles

Mediada por receptor acoplado a proteína G

Las plaquetas pueden ser activadas por muchos agonistas solubles, ya sean liberados de los sitios de lesión de los vasos sanguíneos o en el contexto de in-

flamación o por las plaquetas durante la activación plaquetaria. Estos agonistas activan las plaquetas por unión a sus respectivos receptores plaquetarios de membrana, la mayoría de las cuales están acopladas a receptores de proteína G. Los receptores acoplados a la proteína G son una familia de proteínas de membrana con siete dominios transmembrana, que tras la activación por sus ligandos provocan señalización intracelular mediante la activación de las proteínas heterotriméricas de unión a nucleótidos de guanina (proteínas G). Las proteínas G heterotriméricas consisten en una subunidad alfa en complejo con las proteínas β y γ estrechamente asociadas. En estado inactivo, en el que el complejo de proteína G está asociado al receptor, la subunidad α se une al difosfato de guanosina (GDP) y en complejo con las subunidades β y γ La unión de los agonistas a estos receptores induce cambios conformacionales que activan el intercambio de GDP por trifosfato de guanosina (GTP) en la subunidad G α. En consecuencia, la subunidad G α unida a GTP se disocia de las subunidades β y γ del receptor. La subunidad α enlazada a GTP y las subunidades β y γ luego interactúan con sus respectivas proteínas efectoras corriente abajo propagando diferentes señales. La propagación de la señal G α unida a GTP es luego terminada por la hidrólisis de GTP, que está mediada por la actividad GTPasa intrínseca de las subunidades G α.

G α 12 / 13. G α 13 es necesario para la inducción de agregación y secreción plaquetaria frente a bajas dosis de trombina o U46619 (un análogo de TXA2).

G α q. Tras la activación de los receptores acoplados a proteínas G, la subunidad G α q se disocia del receptor y se une y activa isoenzimas β de PLC que catalizan la hidrólisis de PIP2 para formar segundos mensajeros IP3 y DAG. Las plaquetas que carecen de la subunidad G α q tienen defectos en la liberación de IP3 y no puede movilizar calcio en respuesta a la estimulación agonista de los receptores de proteínas G. G α q es fundamental para la agregación plaquetaria en respuesta a la mayoría de los agonistas como trombina, ADP, 5HT, PAF y TXA2. También es indirectamente importante en la respuesta de las plaquetas a proteínas de adhesión como el colágeno, que requieren la señalización de amplificación inducida por TXA2, ADP, etc. para una activación plaquetaria óptima. Recientemente, se demostró que G α 13 unido a GTP interactúa directamente con el dominio citoplasmático de la subunidad β3 de integrina, y esta interacción es críticamente importante en la señalización de integrina de afuera hacia adentro.

G α i y G α s. Un receptor acoplado a G α i típico es el receptor de ADP P2Y12, y el receptor acoplado a G α típico es el receptor de prostaciclina. G α i / o y G α s se unen a adenilil ciclasa, con G α i inhibiendo pero G α s estimulando la función de adenilil ciclasa para sintetizar AMPc. El AMPc al estimular la proteína quinasa dependiente de AMPc, juega un papel crítico en el mantenimiento de las plaquetas en un estado de reposo, que es el mecanismo por el cual la prostaciclina inhibe la activación plaquetaria. En contraste, G α i, al inhibir la síntesis del potente segundo mensajero inhibidor de plaquetas AMPc, es de importancia crítica en la activación plaquetaria. G α i estimula la activación plaquetaria no solo regulando niveles de AMPc, sino también a través de mecanismos independientes de AMPc. En particular, tras la activación de G α i, se ha demostrado que

G β y γ disociados interactúan y activan PI3K γ y posiblemente también activen isoformas β de PI3K.

5.2. Sinergia entre diferentes receptores de vías de activación plaquetaria

Varios agonistas plaquetarios tienen más de un receptor plaquetario y una activación plaquetaria óptima inducida por estos agonistas a menudo requiere sinergia o cooperatividad entre diferentes vías de receptores.

El ADP, que se libera de gránulos densos en plaquetas o células y tejidos dañados, requiere tanto la señalización de G α q acoplado a P2Y1 y de G α i acoplado a P2Y12 para la activación plaquetaria.

El TXA2 tiene un solo receptor, que, sin embargo, está acoplado tanto a G α q como a G α 12 / 13, y ambas clases de proteínas G son importantes para una respuesta plaquetaria óptima, particularmente en dosis bajas, lo que sugiere una sinergia entre dos caminos diferentes.

La activación plaquetaria inducida por trombina implica un receptor y vías de señalización aún más complejas. La trombina tiene al menos tres receptores en la superficie plaquetaria: PAR1, PAR4 y GPIb-IX en plaquetas humanas. Tras la estimulación con trombina, se ha sugerido que PAR1 forma heterodímeros con PAR4 que mejoran la escisión de PAR4. Además, PAR4 y P2Y12 se informó que se dimerizan, y su interacción promueve la señalización de PAR, lo que lleva a la activación de AKT. PAR1 y PAR4 están acoplados a G α q, G α 13 y posiblemente G α i. La trombina se une y escinde estos receptores para exponer una nueva secuencia NH2-terminal, que sirve como ligando interno para interactuar y activar señalización del receptor. El papel de GPIb-IX (receptor no acoplado a proteína G) en la activación plaquetaria inducida por trombina ha sido controvertida. Mientras que hay evidencia de que GPIb-IX sirve como un muelle para trombina que promueve la escisión por trombina de los PAR, otra evidencia sugiere que GPIb-IX transmite señales de activación plaquetaria independientes de los PAR. Trabajos recientes indican que GPIb-IX no es un muelle pasivo de trombina ni un receptor de trombina independiente de PAR, sino que la cooperación mutua entre la señalización de GPIb-IX inducida por trombina y la señalización PAR es necesaria para una respuesta plaquetaria óptima. La sinergia de estos diferentes receptores mejora en gran medida la sensibilidad plaquetaria a niveles bajos de trombina, que es importante para la trombosis arterial.

5.3. Redes de amplificación de señal

Mientras que los receptores de muchos agonistas plaquetarios y proteínas adhesivas diferentes transmiten señales de activación plaquetaria, estas vías de señalización de receptores divergentes convergen en señales comunes que amplifican en gran medida las señales del receptor inicial que conducen a respuestas plaquetarias robustas.

Fosfolipasa C (PLC)

La PLC es como una central sobre la que numerosas vías de señalización de activación plaquetaria convergen. Las plaquetas expresan al menos tres familias de PLC β, γ y δ. En humanos, PLC β, γ serían los predominantemente expresados en las plaquetas. La PLC β es activada por unión a G α q y la PLC γ se activa por la fosforilación de tirosina de proteína mediada por Syk. Los agonistas acoplados a G alfa q, como la trombina, también indujeron fosforilación y activación de PLC γ a través de una vía de señalización dependiente de especies reactivas de oxígeno. En cambio, los agonistas de ITAM, como el colágeno, inducen la liberación de ADP y TXA2, y activan indirectamente la PLC β a través de la vía G α q.

Entre sus principales funciones, PLC cataliza la hidrólisis de PIP2 en DAG e IP3. IP3 se une al receptor IP3, lo que resulta en la liberación de Ca2 del sistema tubular denso en el citosol, que es un mecanismo importante en la elevación de calcio. La liberación de Ca2 mediada por el receptor IP3 y posterior agotamiento de las reservas intracelulares de Ca2 estimula aún más la entrada de calcio operada por depósitos, causando una elevación Ca2 intracelular sostenida. La elevación del calcio intracelular juega un papel central en la activación plaquetaria inducida por todos los agonistas, por lo que es fundamental para muchos eventos de señalización intracelular, incluida la señalización de la integrina de adentro hacia afuera y la activación de muchas proteínas que incluyen proteína quinasa C (PKC), calpaína y calmodulina.

La elevación del calcio intracelular es necesaria para casi todas las funciones de las plaquetas, incluida la adhesión plaquetaria estable, cambio de forma, agregación, secreción, exposición de la actividad procoagulante y retracción del coágulo. DAG activa las isoformas convencionales y nuevas de la PKC, que también son importantes para la activación de la integrina y la secreción de gránulos de plaquetas.

Vía fosfoinositol- 3-quinasa (PI3K) -Akt

La vía de señalización PI3K-Akt es una importante vía de señalización que induce la liberación de gránulos plaquetarios y es importante para la adhesión estable y activación plaquetaria inducida por la señalización de GPIb-IX, señalización de integrina de afuera hacia adentro, y señalización ITAM. Esta vía, sin embargo, no es necesaria para la activación plaquetaria inducida por agonistas de receptores acoplados a proteínas G pero sirve para amplificar la señalización de los mismos. La estimulación agonista induce la activación de PI3K y, por lo tanto, la generación de PIP3, que media la translocación de membrana de la cinasa dependiente de 3-fosfoinositol 1 (PDK1) y las isoformas de Akt a través de los dominios PH de unión a PIP3 en estas proteínas. Esto permite la fosforilación mediada por PDK1 y la activación de Akt. Dos efectores de Akt se ha demostrado que median en la señalización de PI3K-Akt, que conduce a la secreción de gránulos y la activación plaquetaria: óxido nítrico (ON) sintasa y GSK3 (sintasa de glucógeno quinasa 3) β. Las plaquetas expresan ON sintasa endotelial, que es fosforilada y activada por Akt, y estimula la vía GMPc que conduce a la secre-

ción de gránulos y a la activación plaquetaria dependiente de GPIb-IX. GSK3β, sin embargo, juega roles distintos en diferentes vías de activación plaquetaria: desempeña un papel inhibidor en la activación plaquetaria inducida por trombina y la señalización de integrinas de afuera hacia adentro (que es aliviada por la fosforilación e inhibición de GSK3β mediada por Akt), pero promueve la activación plaquetaria inducida por el colágeno. Sin embargo, el mecanismo exacto de acción de GSK3β aún se desconoce.

Vías de los eicosanoides

Durante la activación plaquetaria, las plaquetas sintetizan especies de lípidos activos, llamados eicosanoides, que funcionan como segundos mensajeros. La síntesis de eicosanoides requiere activación dependiente del calcio de la fosfolipasa citosólica A2 (PLA2), que hidroliza fosfolípidos de membrana para liberar ácido araquidónico. El ácido araquidónico se metaboliza a través de las vías de la ciclooxigenasa y lipoxigenasa. Las ciclooxigenasas (COX), que son inhibidas por la aspirina, inician la conversión de ácido araquidónico en prostaglandinas (PG). Entre varias prostaglandinas sintetizadas en plaquetas, el TXA2 es un potente agonista plaquetario y juega un papel importante en el aumento de la activación plaquetaria y en la promoción de la formación de trombos por unión a su receptor plaquetario acoplado a Gαq / Gα13.

Las lipoxigenasas inician la conversión de ácido araquidónico en oxilipinas, entre las cuales, el ácido 12-hidroxieicosatetraenoico (12-HETE) puede potenciar tanto la activación plaquetaria inducida por agonistas de PAR, como la inhibición de la activación plaquetaria inducida por colágeno y ADP.

Secreción de gránulos como mecanismo de amplificación de señal

Uno de los mecanismos comunes más eficientes de amplificación de señal durante la activación plaquetaria es la secreción del contenido de gránulos de plaquetas. El contenido de los gránulos secretados no solo mejora la señalización de activación plaquetaria, sino que también activa y recluta plaquetas circulantes en reposo, lo que facilita enormemente la formación y crecimiento del trombo.

Además, la secreción de los gránulos contribuye a la remodelación vascular fisiológica, a la inflamación y a la reparación de heridas pero también a la aterosclerosis y al desarrollo de metástasis. Un mecanismo crítico para la liberación del contenido de gránulos, es la fusión de membranas granulares con membranas plasmáticas en la superficie de las plaquetas o en el sistema canalicular abierto; esta fusión permite liberación de gránulos en el medio extracelular. La contracción de las plaquetas luego expulsa el contenido de los gránulos.

Mientras que casi todos los agonistas plaquetarios estimulan la secreción de gránulos de plaquetas, se ha reconocido desde hace mucho tiempo que agonistas "fuertes" como el colágeno y la trombina inducen la secreción de gránulos independientemente de la agregación plaquetaria. Por el contrario, los agonis-

tas "débiles", tales como ADP o bajas concentraciones de los agonistas "fuertes" inducen la secreción de manera dependiente a la agregación, que requiere señalización hacia el exterior de integrina.

5.4 Revaloración de la señalización GMPc a nivel plaquetario

El rol regulador negativo de la activación plaquetaria del GMPc y ON, ha sido cuestionado por el descubrimiento de los roles bifásicos de la vía de señalización NO-GMPc-PKG en la regulación de la activación plaquetaria. Durante la activación plaquetaria bajas concentraciones de ON y GMPc sintetizados endógenamente promueven la activación plaquetaria (retroalimentación positiva) y aumentan significativamente la sensibilidad plaquetaria a bajas concentraciones de agonistas, incluidos los agonistas de GPIb-IX, agonistas del receptor de ITAM y agonistas de receptor acoplado a proteínas G. Además, se han reportado las importantes funciones estimulantes de la vía GMPc-PKG en la señalización de los receptores de reconocimiento de patrones de la activación plaquetaria.
Solo altas concentraciones de ON y de los análogos de GMPc mostraron un efecto inhibidor sobre la activación plaquetaria, principalmente a través de la elevación de AMPc dependiente de GMPc y de la activación de la proteína quinasa dependiente de AMPc, aunque PKG también puede desempeñar un papel en la fase de inhibición. El papel bifásico de la vía GMPc en la activación plaquetaria es probable que sea un importante mecanismo de estimulación autolimitada de la respuesta plaquetaria a estímulos de bajo nivel trombóticos e inflamatorios.

5.5 Señalización de integrinas de adentro-afuera (“inside- out”)

Las integrinas juegan un papel clave en la adhesión y agregación plaquetaria. La integrina plaquetaria más abundante e importante es la αIIbβ3. Esta sirve como receptor de fibrinógeno, FvW, vitronectina y otras proteínas adhesivas de la matriz, y se requiere para una adhesión plaquetaria estable a la pared vascular y para la agregación plaquetaria. En plaquetas circulantes, es expresada en estado de "reposo" con baja afinidad por los ligandos. Después de la estimulación agonista, las señales intracelulares inducen al dominio extracelular de αIIbβ3 a presentar una alta afinidad para ligandos. Este proceso se conoce como señalización de adentro hacia afuera (“inside-out”). Las proteínas talina y kindlinas son proteínas adaptadoras. Varios estudios sugirieron que la unión de talina y kindlinas con la integrina αIIbβ3 coopera para inducir la activación completa de la integrina. El mecanismo responsable de inducir la unión de kindlina y talina a integrinas no está totalmente claro.

5.6 Señalización de integrina de afuera hacia adentro (“outside-in”)

La unión del ligando a las integrinas no solo media la adhesión y agregación plaquetaria, sino que también induce la señalización intracelular. Este proceso es conocido como señalización de afuera hacia adentro (“outside-in”), que en la fase inicial, induce la estabilización de la adhesión plaquetaria, propagación plaquetaria, secreción de gránulos y amplificación de agregación plaquetaria, que es importante para el crecimiento de un trombo intravascular oclusivo. Mientras

que en la fase posterior, estimula la retracción del coágulo. La fase inicial de la señalización de afuera hacia adentro requiere la unión de la proteína Gα13 a β3. Se ha reportado un rol para la kindlina 3 en la señalización de afuera hacia adentro. A su vez, la ligadura de integrina induce la unión de Gα13 y la disociación de talina de β3. La unión Gα13 es importante para la activación de c-Src mediada por integrina y la inhibición de RhoA y la activación de la vía PI3K/Akt. Todos estos eventos conducen a la secreción de gránulos dependiente de integrinas y la amplificación del crecimiento del trombo. En la fase tardía, se anula la inhibición dependiente de Src de RhoA, lo que resulta en la activación de RhoA y retracción del coágulo mediada por plaquetas. Curiosamente la talina se vuelve a asociar con el dominio citoplasmático de β3 durante la última fase de señalización de afuera hacia adentro y es importante para la retracción del coágulo.

6. REORGANIZACIÓN DEL CITOESQUELETO

Una modificación importante que tiene lugar como consecuencia de la activación de las plaquetas, es la reorganización de su citoesqueleto. Esto resulta en un rápido incremento de la polimerización de la actina y en la formación de un entramado de nuevos filamentos en la periferia de la parte interna de la membrana plasmática. Cuando se produce la agregación plaquetaria, la reorganización del citoesqueleto se intensifica y esto resulta en una asociación de la GPIIb-IIIa, varias proteínas que se unen a la actina y moléculas de señalización con el citoesqueleto reorganizado. El ensamblaje de la glicoproteína a las estructuras del citoesqueleto se piensa que regula las propiedades adhesivas del receptor y estabiliza la unión del fibrinógeno al mismo por mecanismos aún no clarificados.

Durante mucho tiempo se ha considerado la reorganización del citoesqueleto como un componente principalmente mecánico del sistema contráctil, responsable, por ejemplo, del cambio de forma de las plaquetas, la emisión de pseudópodos y la retracción del coágulo. Los datos en la literatura de los últimos años hacen evidente que el citoesqueleto juega también un papel muy importante en la transmisión de señales a través de la membrana y en la regulación de los mecanismos de señalización en las plaquetas.

Existe un gran número de moléculas que en las plaquetas en reposo se encuentran en el citoplasma y que como consecuencia de la activación se relocalizan en el citoesqueleto. Entre estas se encuentran varias proteínas tirosina kinasas, fosfolipasas y otras moléculas de señalización. De este modo, el citoesqueleto reorganizado da soporte para que se produzca el ensamblaje de glicoproteínas, proteínas contráctiles del propio citoesqueleto y diversas moléculas de señalización para formar los complejos multimoleculares que se cree regulan la respuesta funcional de las plaquetas. Aunque el mecanismo exacto de la remodelación del citoesqueleto no es completamente conocido, se ha implicado la participación activa en el mismo tanto de las proteínas G de bajo peso molecular como la mediación del metabolismo del fosfatidilinositol regulando los mecanismos de polimerización de la actina a través de efectos en sus proteínas asociadas. La función de estos complejos multimoleculares en el citoesqueleto podría ser la

unión de receptores glicoproteínas con otras proteínas celulares como sistema de señalización hacia el citoplasma de la célula.

Además de la conocida función contráctil del citoesqueleto y su papel esencial en la retracción del coágulo, el ensamblaje de la actina y de sus proteínas asociadas, toma un papel protagonista en el escenario de la activación de las plaquetas.

7. CONSOLIDACIÓN DEL TROMBO

La activación plaquetaria libera factores de la coagulación contenidos en sus gránulos y convierte la superficie de las plaquetas en una superficie procoagulante que contribuye a la generación de trombina. La generación de trombina depende de la formación de protrombinasa, un complejo de FXa y FVa membrana dependiente que cataliza la escisión de protrombina a trombina. Además, la vía del factor tisular activa el receptor PAR, y este interacciona con el factor XI. El factor XIa interacciona con las plaquetas ya activadas, con el factor IX, y la proteasa nexina-2. Además, se ha descrito el factor XI plaquetario, detectado en la membrana plaquetaria y que supone el 0,5% de la actividad plasmática del FXI. Es diferente al FXI plasmático. Las plaquetas no solo aportarían la superficie fosfolipídica sino que su participación en su forma activada está presente durante todos los procesos.

La superficie biológica primaria para el ensamblaje y la función de la protrombinasa, hasta ahora se ha considerado proporcionada por plaquetas activadas. En los últimos años, se ha sugerido que el endotelio tiene una importante y prominente función en este proceso. Se ha demostrado que el endotelio dañado/activado puede proporcionar una superficie de membrana procoagulante para la unión de FVa y FXa para producir protrombinasa para la generación posterior de trombina. La trombina formada escinde fibrinógeno en fibrina. La fibrina formada, se intercala entre las células del trombo plaquetario y en la superficie externa del mismo. El trombo se consolida mediante la retracción del coágulo, un proceso mediado por GPIIb-IIIa, que asocia fuertemente las células a la fibrina, haciendo el tapón hemostático prácticamente impermeable y capaz de resistir la presión del flujo sanguíneo.

Se destaca también que una vez que se ha formado y consolidado un trombo, las células endoteliales expuestas en su actividad fibrinolítica a través de la liberación del t-PA establecen límites estrictos al grado de formación de coágulos. Los desencadenantes de la liberación de t-PA del endotelio son predominantemente FXa y trombina. t-PA convierte plasminógeno en plasmina que disuelve la fibrina.

En este capítulo, se ha descrito a los participantes y a los procesos que llevan a la formación del trombo plaquetario (hemostasia primaria). En el capítulo 13 se abordará la hemostasia secundaria.

8. LECTURAS SUGERIDAS

Endotelio

Neubauer, K., Zieger, B. Endothelial cells and coagulation. Cell Tissue Res (2021). https://doi.org/10.1007/s00441-021-03471-2

Wang M, Hao H, Leeper NJ, Zhu L. Thrombotic Regulation From the Endothelial Cell Perspectives. 2018;38(6):e90-e5. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.310367

Kiseleva, R. Y., Glassman, P. M., Greineder, C. F., Hood, E. D., Shuvaev, V. V., & Muzykantov, V. R. (2017). Targeting therapeutics to endothelium: are we there yet? Drug Delivery and Translational Research, 8(4), 883–902. doi:10.1007/s13346-017-0464-6

Kazmi R, Boyce S, BA L. Homeostasis of Hemostasis: The Role of Endothelium. PG - 549-55 LID - 10.1055/s-0035-1556586 [doi]. 2015;(1098-9064 (Electronic)).

Plaquetas

Van der Meijden, P.E.J., Heemskerk, J.W.M. Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. Nat Rev Cardiol 16, 166–179 (2019). https://doi.org/10.1038/s41569-018-0110-0

Yeung J, Li W, Holinstat M. Platelet Signaling and Disease: Targeted Therapy for Thrombosis and Other Related Diseases. Pharmacol Rev. 2018 Jul;70(3):526-548. doi: 10.1124/pr.117.014530.

Kerris EWJ, Hoptay C, Calderon T, Freishtat RJ. Platelets and platelet extracellular vesicles in hemostasis and sepsis. J Investig Med. 2020 Apr;68(4):813-820. doi: 10.1136/jim-2019-001195.

Rand ML, Reddy EC, Israels SJ. Laboratory diagnosis of inherited platelet function disorders. Transfus Apher Sci. 2018 Aug;57(4):485-493. doi: 10.1016/j.transci.2018.07.009.

Adhesión, agregación, secreción

Lordan R, Tsoupras A, Zabetakis I. Platelet activation and prothrombotic mediators at the nexus of inflammation and atherosclerosis: Potential role of antiplatelet agents. Blood Reviews. 2021;45:100694.

Scharf RE. Platelet Signaling in Primary Haemostasis and Arterial Thrombus Formation: Part 1. Hamostaseologie. 2018;38(04):203-10.

Twomey L, Wallace R, Cummins P, Degryse B, Sheridan S, Harrison M, et al. Platelets- From Formation to Function. 2018.

Hosseinzadegan H, Tafti D. Mechanisms of Platelet Activation, Adhesion and Aggregation. Thrombosis and haemostasis. 2017;1.

Secuencia bioquímica de activación plaquetaria

Estévez B, Du X. New Concepts and Mechanisms of Platelet Activation Signaling. Physiology (Bethesda). 2017 Mar;32(2):162-177. doi: 10.1152/physiol.00020.2016. PMID: 28228483; PMCID: PMC5337829.

Rubenstein, D. A., & Yin, W. (2018). Platelet-Activation Mechanisms and Vascular Remodeling. Comprehensive Physiology, 1117–1156. doi:10.1002/cphy.c170049

Lordan R, Tsoupras A, Zabetakis I. Platelet activation and prothrombotic mediators at the nexus of inflammation and atherosclerosis: Potential role of antiplatelet agents. Blood Reviews. 2021;45:100694.

Ludhiadch, A., Abhishek, M., Balyan, R., & Munshi, A. (2020). The molecular basis of platelet biogenesis, activation, aggregation and implications in neurological disorders. International Journal of Neuroscience, 1–19. doi:10.1080/00207454.2020.1732372

Reorganización del citoesqueleto

Bender, M., & Palankar, R. (2021). Platelet Shape Changes during Thrombus Formation: Role of Actin-Based Protrusions. Hämostaseologie, 41(01), 014–021. doi:10.1055/a-1325-0993.

Thomas, S. G. (2019). The Structure of Resting and Activated Platelets. Platelets, 47–77. doi:10.1016/b978-0-12-813456-6.00003-5

Ghalloussi, D, Dhenge, A, Bergmeier, W. New insights into cytoskeletal remodeling during platelet production. J Thromb Haemost. 2019; 17: 1430– 1439. https://doi.org/10.1111/jth.14544

Consolidación del trombo

Ye T, Shi H, Phan-Thien N, Lim CT. The key events of thrombus formation: platelet adhesion and aggregation. Biomech Model Mechanobiol. 2020 Jun;19(3):943-955. doi: 10.1007/s10237-019-01262-x.

Qiao, J., Arthur, J. F., Gardiner, E. E., Andrews, R. K., Zeng, L., & Xu, K. (2018). Regulation of platelet activation and thrombus formation by reactive oxygen species. Redox biology, 14, 126–130. https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.08.021

Alkarithi G, Duval C, Shi Y, Macrae FL, Ariëns RAS. Thrombus Structural Composition in Cardiovascular Disease. 2021;41(9):2370-83.

Capítulo

13

SISTEMA DE LA COAGULACIÓN

Simón Navarrete P., Neftalí Guzmán O., Eduardo Fuentes Q., Iván Palomo G.

Resumen

1. Introducción

2. Estructura, síntesis y función de los factores de la coagulación
2.1. Nomenclatura de los factores de la coagulación
2.2. Estructura genérica de las enzimas de la coagulación
2.3. Factor XI y factores del sistema de contacto
2.4. Factores vitamina K dependiente
2.5. Cofactores V, VIII y Factor Tisular
2.6. Complejos macromoleculares
2.7. Fibrinógeno, FXIII y formación de fibrina

3. Modelos de la coagulación
3.1. Modelo clásico
3.2. Modelo de la cascada de coagulación
3.3. Modelo celular

4. Regulación del sistema de la coagulación
4.1. Sistema antitrombina III
4.2. Sistema de la proteína C
4.3. Inhibidor de la vía extrínseca
4.4. Inhibidor de proteasas dependiente de proteína Z

5. Variaciones fisiológicas de factores de coagulación
5.1. Variaciones de factores de coagulación en neonatos y niños
5.2. Variaciones de factores de coagulación en embarazo

6. El sistema de coagulación y su relación con la respuesta inmune

7. Lecturas sugeridas

RESUMEN

La hemostasia secundaria o sistema de la coagulación corresponde a un proceso caracterizado por la activación secuencial de una serie de proteínas plasmáticas denominadas factores de la coagulación. Su propósito general es la formación de una malla de fibrina insoluble que le otorgue resistencia al tapón plaquetario formado en el sitio de la injuria vascular, siendo un mecanismo localizado, autolimitado y finamente regulado por proteínas y/o complejos denominados anticoagulantes naturales. Desde su descripción inicial, diversos modelos de coagulación han sido descritos, siendo el más actual el modelo celular que le otorga importancia a la participación de diferentes células en el proceso. Este capítulo aborda la importancia del sistema de la coagulación, profundizando en las proteínas involucradas y mecanismos relevantes de regulación. Además, aborda en los distintos enfoques de modelos de coagulación hasta el modelo celular, analizando las variaciones fisiológicas de la coagulación en poblaciones especiales y la relación de la coagulación con la respuesta inmune.

1. INTRODUCCIÓN

La hemostasia es el mecanismo necesario para mantener la integridad de los vasos sanguíneos, evitando la pérdida de sangre y reestableciendo el flujo sanguíneo al ser reparada la lesión. Clásicamente, la coagulación se encuentra dividida en dos fases, la hemostasia primaria basada en la respuesta plaquetaria y que se inicia con una vasoconstricción local, al momento de generarse la lesión, limitando el flujo de sangre en la zona. Posteriormente en la hemostasia secundaria se observa la activación secuencial de proteínas plasmáticas que determinan la formación de una malla de fibrina insoluble que es relativamente resistente a procesos de degradación química, mecánica y a la fibrinolisis, otorgando soporte al tapón plaquetario. De modo general, estas reacciones implican la activación de precursores inactivos, sobre los que actúan una serie de proteínas con actividad proteolítica denominadas serinoproteasas, y que permiten que dichos precursores sean transformados a su forma enzimática activa.

2. ESTRUCTURA, SÍNTESIS Y FUNCIÓN DE LOS FACTORES DE LA COAGULACIÓN

2.1. Nomenclatura de los factores de la coagulación

Para mediados de la década de 1950 habían sido descritos una gran cantidad factores de la coagulación, siguiendo una nomenclatura no estandarizada, lo que llevó a algunos investigadores a proponer la generación de una nomenclatura de consenso. Así, en el año 1959 se designaron los factores con números romanos del I al IX, integrando con posterioridad los factores de coagulación del X al XIII.

Esta designación se realizó de acuerdo al orden de su descubrimiento y no al orden en que intervienen en el proceso o cascada de la coagulación. En la tabla 13-1 se presenta la nomenclatura y función de los diversos factores de la coagulación.

Tabla 13-1. Nomenclatura y función de los factores de la coagulación

Factor	Sinónimo	Función
I	Fibrinógeno	Estructural
II	Protrombina	Serino Proteasa
III	Factor tisular, tromboplastina tisular	Cofactor/iniciador
IV	Calcio	
V	Factor lábil, proacelerina	Cofactor
VI	No asignado	
VII	Proconvertina, Factor estable	Serino Proteasa
VIII	Globulina o Factor antihemofílico A	Cofactor
IX	Factor Christmas o antihemofílico B	Serino Proteasa
X	Factor Stuart Prower	Serino Proteasa
XI	Factor antihemofílico C	Serino Proteasa
XII	Factor de Hageman	Serino Proteasa
XIII	Factor estabilizador de la fibrina	Transglutaminasa
PK	Precalicreína o Factor de Fletcher	Serino Proteasa
HMWK	Cininógeno de alto peso molecular	Cofactor

Los factores de coagulación circulan en la sangre en forma inactiva, como cimógenos, excepto el factor III (factor tisular, FT) que normalmente no se encuentra en el plasma, sino que se expresa sobre la superficie de diversas células como monocitos, células endoteliales activadas, fibroblastos, entre otras. Desde el punto de vista de la nomenclatura, cuando un factor se activa, es decir, se transforma en enzima, se le adiciona la letra “a” a la designación numérica, por ejemplo, el factor IX activado se designa como IXa. Sin embargo, existen varias excepciones a esta terminología, el factor II (protrombina) en su forma activa se le conoce como trombina, más que como IIa y cuando el factor I (fibrinógeno) sufre proteólisis parcial por la acción de trombina, se denomina fibrina, la cual constituye el producto final de la cascada de la coagulación. El factor tisular y el calcio no son cimógenos y por tanto no tienen forma activada.

De modo general, los cimógenos son activados a enzimas a través de una proteólisis parcial. Como enzima actúa sobre otro sustrato que lo sigue en la secuencia transformándolo a su vez en enzima. Los factores V y VIII circulan como procofactores y participan como activadores no proteolíticos (cofactores) de enzimas, para ello deben activarse, denominándose Va y VIIIa.

2.2. Estructura de las enzimas de la coagulación

Los factores XII, XI, IX, X, VII, II y precalicreína (figura 13-1), una vez activados, son enzimas que pertenecen a la misma familia de las proteasas digestivas, tripsina y quimiotripsina. Por su potente actividad proteolítica procoagulante y por actuar en el interior de los vasos sanguíneos, estos factores requieren de regulación muy precisa. Las enzimas de la coagulación son de mayor peso molecular que la tripsina y la quimiotripsina; tienen varios sitios funcionales y un sitio catalítico ubicado en la mitad del extremo carboxilo-terminal de las moléculas. Estructuralmente corresponden a las llamadas serino-proteasas que poseen un residuo de ácido aspártico (D), serina (S) e histidina (H) en el sitio catalítico. Esta zona es la encargada de la ruptura de los enlaces peptídicos, de reconocer los sustratos macromoleculares y de interactuar con los inhibidores que regulan su actividad.

Cerca del extremo amino-terminal de factores vitamina K dependiente (Factores II, VII, IX y X), se encuentra un dominio rico en residuos de ácido γ-carboxiglutámico. Esta región consta de un sitio de reconocimiento que dirige la γ-carboxilación luego de su síntesis, y de 10 a 12 residuos de ácido γ-carboxiglutámico, que unen calcio e interactúan con las membranas celulares, lo que reviste gran importancia durante la activación del sistema de la coagulación. Por su parte, las proteínas C, S y Z, inhibidores naturales de la coagulación, también corresponden a proteínas vitamina K dependientes.

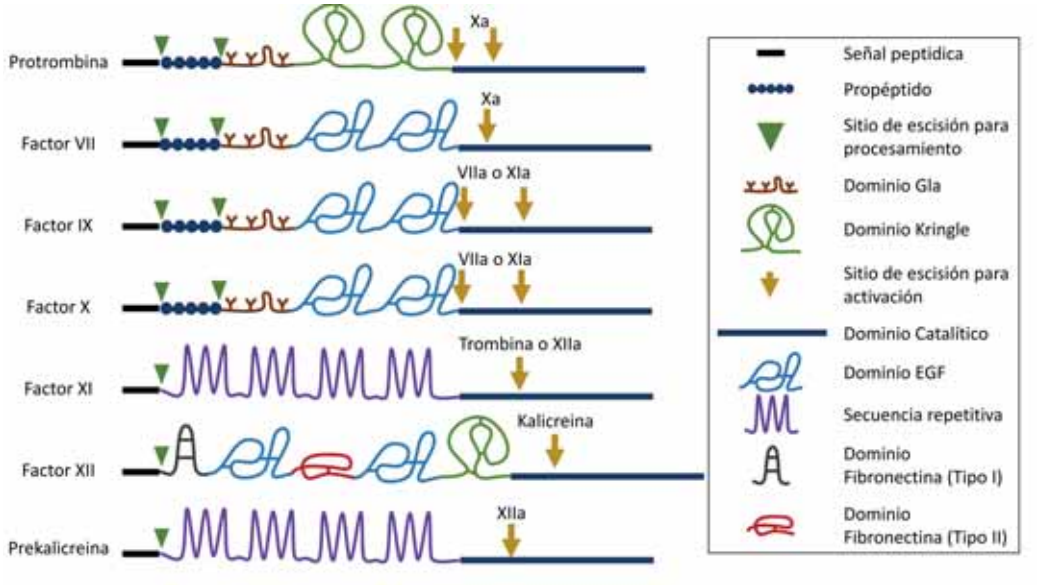


Figura 13-1. Esquema de la estructura de los factores II, VII, IX, X, XI, XII y PK.

2.3. Factor XI y factores del sistema de contacto

El **factor XI** es sintetizado en el hígado y secretado como un cimógeno de cadena simple de 607 aminoácidos (80 kDa), mientras que en circulación forma un homodímero (160 kDa) compuesto por dos subunidades idénticas unidas por enlaces disulfuro en el residuo Cys321, interacciones hidrofóbicas y un puente salino, formando un complejo con el Cininógeno de Alto Peso Molecular (HMWK por sus siglas en inglés). Su concentración plasmática es de 5 µg/mL y su vida media es de 60 a 80 horas. El gen que codifica para FXI (*F11*) se encuentra en el brazo largo del cromosoma 4 (4q35), posee 15 exones y 14 intrones. Estructuralmente, cada subunidad del factor XI tienen 4 dominios repetidos, llamados dominios manzana (*apple domains*) y un dominio serino proteasa. Su activación se produce por proteólisis en el sitio de Arg369 de la región N-terminal del dominio serino proteasa. La función del factor XIa es activar al factor IX en presencia de calcio. En condiciones fisiológicas es inhibido por antitrombina III, α2-antiplasmina, inhibidor de C1 (C1-INH), inhibidor de proteasa dependiente de proteína Z (ZPI), α1 antitripsina y por el inhibidor liberado de plaquetas anti-XIa.

Por su parte, los **factores del sistema de contacto** corresponden al FXII, el HMWK y la PK. La activación de este sistema contribuye en la activación del FXI (el FXIIa activa al FXI) y los factores de contacto interrelacionan con el sistema del complemento, la pro-renina, bradicinina y plasminógeno, funciones que se presentan en la figura 13-2.

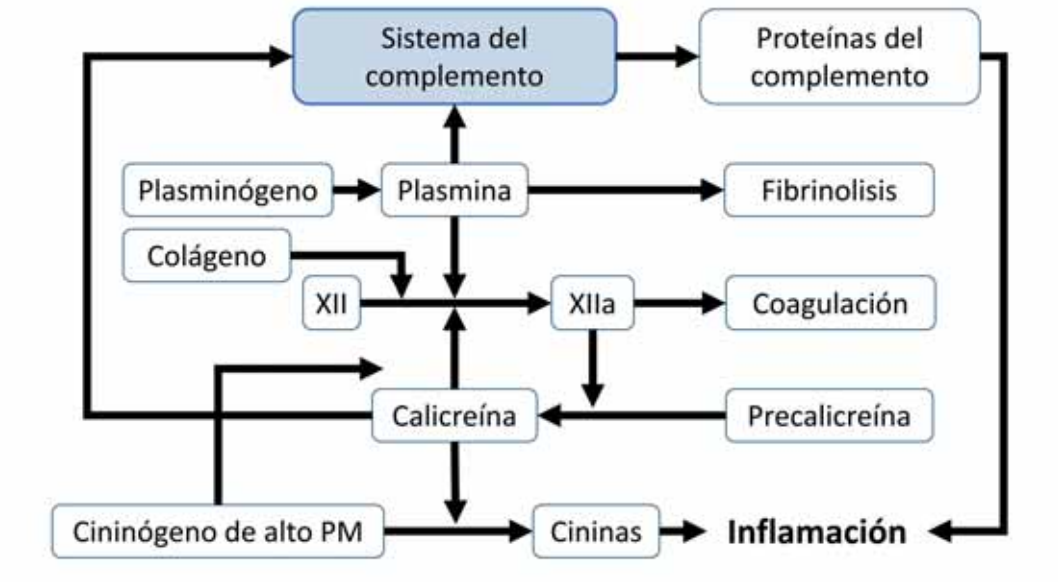


Figura 13-2. Función de los factores de contacto en otros sistemas fisiológicos.

El **factor XII** fue originalmente denominado factor Hageman siendo inicialmente reportado en 1955. Corresponde a una glicoproteína de síntesis hepática que

circula en plasma como un cimógeno de cadena simple de 596 aminoácidos (80 kDa). Su concentración plasmática es de 40 µg/mL y su vida media es de 50 a 70 horas. El gen que lo codifica se encuentra en el cromosoma 5 (5q35.3) y contiene 14 exones. Estructuralmente, posee un dominio fibronectina tipo I en región N-terminal, seguido de un dominio EGF, un dominio fibronectina tipo II, otro dominio EGF, un dominio *kringle* y una región rica en prolina que no posee ninguna otra serino proteasa. La activación de FXII se produce por proteólisis en Arg353 mediada por calicreína. Esto genera un factor activo con dos cadenas (una cadena pesada y una liviana) unidas por puente disulfuro. La activación del FXII también se produce por cargas negativas. La función del FXIIa es activar al FXI, además activa a PK contribuyendo a su propia activación por retroalimentación.

La **precalicreína** es sintetizada en el hígado (85 kDa), su concentración plasmática es de 40 µg/mL y su vida media es de 35 horas. En circulación, forma un complejo 1:1 con el HMWK. Por proteólisis genera su forma activa, la calicreína, que está formada por 2 cadenas polipeptídicas, una pesada (52 kDa) y una liviana (33 kDa) unidas por puentes disulfuro.

Finalmente, el **HMWK** es sintetizado en hígado (120 kDa), su concentración plasmática es de 80 µg/mL y su vida media es de 150 horas. Circula en complejo con el factor XI y las PK, facilitando la adhesión de estos factores a la superficie de contacto.

La activación de este sistema se inicia por la adherencia del factor XII a superficies con carga negativa a través de una secuencia aminoacídica con carga positiva. La unión produce un cambio conformacional que lo hace muy sensible a la autoactivación por cantidades traza de factor XIIa. Sustancias inertes como el vidrio, kaolín, ácido elágico y celita activan este factor, por lo que esta propiedad se usa in vitro para activar el factor XII y realizar el tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPA), una prueba global de coagulación ampliamente utilizada en la práctica clínica. También existen activadores biológicos como el colágeno, el cartílago articular y la piel, entre otros.

La formación de complejos entre el HMWK, la PK y el factor XI favorece su unión a superficies donde las proenzimas sufren una proteolisis limitada por acción del factor XIIa. Este último convierte la PK y el factor XI en serino proteasas activas: calicreína y factor XIa, respectivamente. La calicreína activa el factor XII adherido a superficies en una reacción más rápida que la autoactivación inicial. La calicreína hidroliza el HMWK liberando bradiquinina, que actúa como vasodilatador y aumenta la permeabilidad vascular. La molécula de HMWKa tiene más afinidad por las superficies aniónicas y más actividad como cofactor en la generación de calicreína y factor XIa. Además, la calicreína activa directamente al plasminógeno transformándolo en plasmina, escinde el C3b del complemento y convierte la pro-renina en renina. Así, la activación del sistema de contacto asocia el mecanismo de la coagulación con la respuesta inflamatoria y la reparación tisular.

Desde el punto de vista clínico, las deficiencias de los factores de contacto son muy poco frecuentes. Desde la perspectiva del laboratorio, se manifiestan por un tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPA) prolongado en ausencia de sangrado.

El déficit hereditario de Factor XII es el más frecuente dentro del grupo de los factores de contacto y su modelo de herencia es autosómico recesivo. Así, los niveles plasmáticos en pacientes homocigotos son <0,01 U/mL, mientras que en heterocigotos son de aproximadamente de 0,17-0,83 U/mL. Como se señaló previamente son pacientes que no sangran y pueden tener tendencia a la trombosis, siendo la prolongación del TTPA mas relevante en el homocigoto y de menor magnitud en pacientes heterocigotos. Finalmente, el diagnóstico se confirma cuantificando este factor, principalmente por métodos coagulométricos basados en el uso de plasma deficiente en este factor de coagulación.

Por su parte, el déficit de precalicreína corresponde a un desorden poco frecuente y con escasas manifestaciones clínicas, sin embargo, se presenta como un TTPA muy prolongado sin tendencia al sangrado. Se hereda en forma autosómica recesiva y los heterocigotos tienen niveles intermedios de precalicreína. Si se realiza un estudio de mezcla 1:1 con plasma normal y se deja incubar durante 10 min y el TTPA corrige se sospecha un déficit de precalicreína. Finalmente, el déficit congénito de cininógeno de alto peso molecular es el menos frecuente dentro de su grupo.

2.4. Factores vitamina K dependiente

Los factores II, VII, IX y X, además de las proteínas reguladoras C, S y Z dependen de la vitamina K para expresar su potencial procoagulante y anticoagulante respectivamente. Estas proteínas presentan 10 a 12 residuos de ácido glutámico cerca del extremo amino-terminal denominados dominios Gla, los cuales se generan en la carboxilación del glutamato por la enzima carboxilasa vitamina K dependiente, localizada en la membrana del retículo endoplásmico rugoso. Los dominios Gla permiten unir calcio, lo que favorece la unión a los fosfolípidos aniónicos de las superficies celulares activadas, especialmente en plaquetas.

La vitamina K necesaria para la síntesis de estos factores debe estar en su forma reducida (Vitamina K-Hidroquinona, KH2); en el hígado se encuentra en estado de quinona, la que debe ser reducida por la vitamina K reductasa a KH2 que participa en el proceso de carboxilación del glutamato. Luego esta se oxida por acción de la γ-glutamil carboxilasa a vitamina K epóxido y esta, por la enzima epóxido reductasa, es reducida a vitamina K quinona, completando así el ciclo de la vitamina K (figura 13-3).

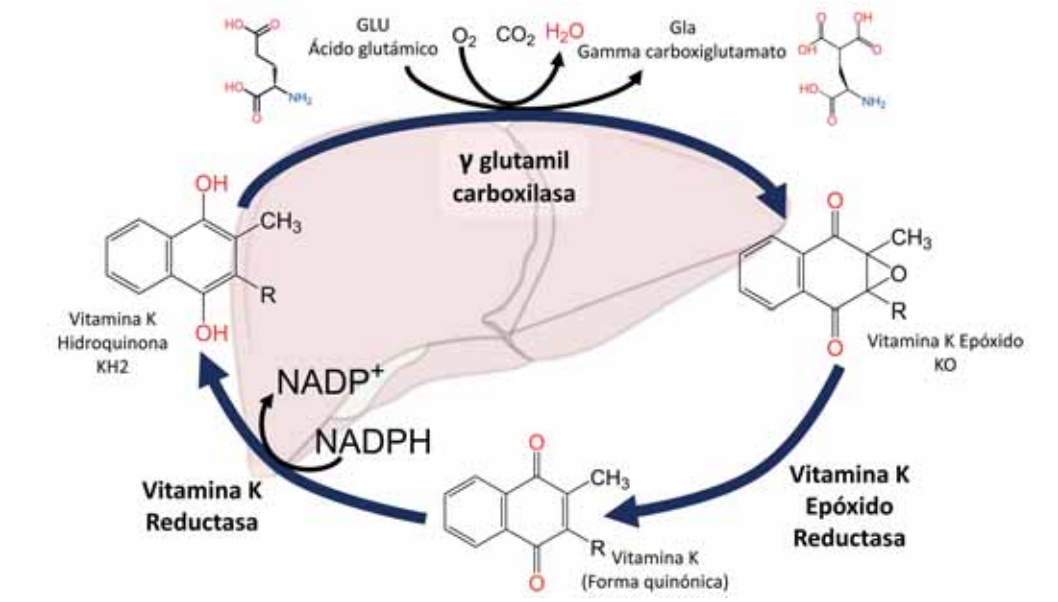


Figura 13-3. Ciclo de la vitamina K

La carboxilasa dependiente de vitamina K (γ-glutamil carboxilasa) corresponde a una proteína transmembrana de 758 aminoácidos que se encuentra en el retículo endoplásmico rugoso. Su extremo amino-terminal es hidrofóbico, presenta varios dominios transmembrana y está en contacto con el citoplasma de la célula. El extremo carboxi-terminal es hidrofílico y se encuentra en contacto con el lumen del retículo endoplásmico rugoso. La enzima γ-glutamil carboxilasa cataliza dos reacciones químicas: (a) adición de dióxido de carbono (CO2) al glutamato formando Gla y (b) oxidación de la vitamina K hidroquinona a vitamina K 2,3 epóxido, con la concomitante formación de oxígeno y agua. Se ha observado *in vitro* que en presencia de concentraciones adecuadas de sustrato se forma Gla y vitamina K epóxido en relación 1:1. Este aparente acoplamiento de la epoxidación y γ-carboxilación sugiere que existe un mecanismo por el cual la enzima utiliza la energía liberada por la oxidación de vitamina K y la conduce a la reacción de γ-carboxilación. En el paso de vitamina K hidroquinona a vitamina K epóxido se sintetiza un intermediario, vitamina K alkoxide, el cual actúa sobre el grupo γ-metileno del glutamato y formando un intermediario del glutamato llamado glutamato carbonion; luego por la adición de CO2 a este intermediario se forma el Gla. En la carboxilasa existen dos cisteínas catalíticas (Cys99 y Cys950), una cisteína que actúa como una base débil y cataliza la desprotonización de KH2 y formando así al intermediario alkoxide; la otra cisteína coordina al CO2 catalizando el acceso de esta molécula al glutamato carbonion y formando Gla. Mutaciones en dichas cisteínas causan marcada disminución en la actividad de la carboxilasa.

Los factores vitamina K dependientes unen un propéptido de aproximadamente 18 aminoácidos ubicados en el extremo amino-terminal. El propéptido se une al sitio de unión de la enzima, el cual es distinto al sitio activo de la misma.

Los factores vitamina K dependientes son sintetizados en forma de precursor (pre-pro-proteína). El propéptido permite la traslocación del precursor a través de una pre-convertasa en la membrana del retículo endoplásmico rugoso en donde es sintetizada. La pre-secuencia se adhiere a un péptido señal ubicado en el lumen del retículo endoplásmico y así la pro-proteína es reconocida por la carboxilasa. Se ha observado que mutaciones puntuales en este propéptido reducen o eliminan sustancialmente la carboxilación del sustrato en cultivos celulares. Luego que se produce la γ-carboxilación, la proteína sanguínea es transportada al aparato de Golgi, en donde el propéptido es removido y el factor vitamina K dependiente sale a circulación en forma de zimógeno.

El propéptido es el mejor determinante de afinidad de las proteínas vitamina K dependientes para la carboxilasa, mientras que los dominios vecinos Gla parecen jugar un rol menos importante en su reconocimiento. Existe marcada homología entre los propéptidos de los diferentes factores vitamina K dependientes humanos, lo que supone similar afinidad por la carboxilasa.

Farmacológicamente, los antagonistas de la vitamina K poseen estructuras similares a los distintos tipos de vitamina K, así los derivados de las indandiona simulan la vitamina K epóxido, actuando como sustrato de la enzima vitamina K epóxido reductasa dando lugar a una molécula similar pero no igual a vitamina K quinona, la cual no podrá ser convertida en vitamina K hidroquinona, produciéndose carencia de esta última y generando factores inactivos. Por otro lado, los derivados de la cumarina, que poseen una estructura muy similar a vitamina K quinona compiten como sustrato por la vitamina K quinona reductasa que las convierte en una molécula similar a la vitamina K hidroquinona pero que no es funcional. El déficit de vitamina K o su inhibición por cumarínicos se traduce en síntesis hepática y secreción a la sangre de factores vitamina K dependiente descarboxilados o parcialmente carboxilados (afuncionales), sin capacidad para unir calcio y fijarse a las membranas, y por lo tanto con una escasa o nula función procoagulante.

Los factores dependientes de vitamina K son esencialmente sintetizados en los hepatocitos. Los macrófagos también sintetizan los factores II, VII, IX y X, y las células endoteliales tienen la capacidad de síntesis y secreción de la proteína S.

La **protrombina** o factor II, descrita en 1894, es sintetizada en el hígado como una proteína de cadena simple con un peso molecular de 72 kDa. Su concentración plasmática es de aproximadamente 100 µg/mL y presenta una vida media de 60 horas. El gen que la codifica (*F2*) se encuentra en cromosoma 11 (11p11.2) y contiene 14 exones. Estructuralmente la proteína está compuesta de fragmento 1, fragmento 2 y el dominio serino proteasa. El fragmento 1 está compuesto del dominio Gla y el dominio *kringle* 1, mientras que el fragmento 2 contiene el dominio *kringle* 2. La función principal de los dominios *kringle* es unir otras proteínas como el cofactor Va y el factor Xa que forman parte del complejo protrombinasa que activa a la protrombina realizando una proteólisis en residuos Arg271 y Arg320. El clivaje en Arg320 abre el sitio catalítico, mientras que

el clivaje en Arg271 elimina el fragmento 1.2 (F1.2). La determinación del F1.2 refleja el grado de activación de protrombina y es usado como marcador de generación de trombina.

La **trombina** o FIIa es una serino proteasa formada por 2 cadenas, una cadena liviana o cadena A (6000 Da) y otra pesada o cadena B (31 kDa). La molécula de trombina tiene 3 sitios de unión y un sitio catalítico. Los tres sitios de unión son: de reconocimiento de fibrinógeno y otros sustratos (S); el sitio de unión de la heparina, en el cual la heparina se une a Antitrombina III para aproximarla a la trombina (H); y el sitio de unión a fibrina (F) a través del cual la trombina se une a la fibrina después de que ha transformado el fibrinógeno. Finalmente, el centro catalítico o C corresponde al sitio en el cual la trombina escinde los sustratos. La principal función de la trombina es generar fibrina a partir de fibrinógeno, sin embargo, también activa los cofactores V y VIII, los factores FXI y FXIII, al inhibidor de la fibrinólisis activado por trombina (TAFI) y se une al receptor de trombina de las plaquetas activándolas. Adicionalmente, la trombina también tiene efectos regulatorios en el sistema de la coagulación: (a) inhibe su propia generación al actuar sobre la protrombina, rompiendo enlaces en dos regiones de la molécula, desconectando el dominio de los ácidos γ carboxiglutámico e impidiendo la unión a fosfolípidos y (b) promueve el sistema anticoagulante natural por medio de la activación de la proteína C por medio de su unión a la trombomodulina para formar un complejo.

El **factor VII** es sintetizado en el hígado como una proteína de cadena simple y tiene un peso molecular de 50 kDa. Su concentración plasmática es 0,5 µg/mL y su vida media es de 3 a 6 horas. El gen que la codifica está ubicado en el cromosoma 13 (13q34) y presenta 9 exones. Estructuralmente presenta un dominio Gla, dos dominios EGF, una región conectora y un dominio serino proteasa. Su activación ocurre, una vez unido a factor tisular, por proteólisis en Arg152. Las proteasas que pueden activarlo son FIXa, FXIIa, Xa y también puede ocurrir autoactivación por VIIa. El FVIIa está compuesto por una cadena liviana (20 kDa) y una cadena pesada (30 kDa) unidas por puente disulfuro. La actividad catalítica del FVIIa solo se expresa cuando está unido a FT, formando un complejo (FVIIa-FT) que activa factores IX y X.

El **factor IX**, también denominado factor Christmas, es sintetizado en el hígado como una proteína de cadena simple y tiene un peso molecular de 55 kDa, siendo su concentración plasmática 5 µg/mL y su vida media de 18 a 24 horas. Se encuentra codificado en el cromosoma X (Xq27) y el gen contiene 8 exones. Estructuralmente presenta un dominio Gla, dos dominios EGF, un péptido de activación de 35 residuos y un dominio serino proteasa. El FIX es activado por FXIa y por el complejo FT-FVIIa. El FIXa está formado por dos cadenas (45 kDa), una liviana (17 kDa) y una pesada (28 kDa). La función del FIXa es activar al FX y para que ello ocurra debe unirse al cofactor VIIIa, ya que, dicha unión favorece el acceso del sustrato al sitio activo. El FIXa sin cofactor tiene una baja eficiencia catalítica, pues el sitio activo dificulta el acceso al sustrato, situación que es revertida con la unión de FVIIIa.

El **factor X** o factor Stuart-Prower es sintetizado en el hígado como un precursor de cadena simple, pero por procesamiento intracelular se genera un cimógeno de 2 cadenas que finalmente es el que circula en plasma. Tiene un peso molecular de 59 kDa, su concentración plasmática es 10 µg/mL y su vida media es de 34 a 40 horas. Se encuentra codificado en el cromosoma 13 (13q34) y su gen tiene 8 exones. Su estructura comprende un dominio Gla y un dominio EGF ubicados en la cadena liviana (16 kDa) y un péptido de activación de 52 residuos más el dominio serino proteasa ubicados en la cadena pesada (42 kDa). Ambas cadenas están unidas por puente disulfuro. El FX es activado, por escisión del péptido de activación de 52 residuos, por el complejo tenasa intrínseco (FVIIIa-FIXa) o por el complejo tenasa extrínseco (FT-FVIIa). El FXa se une con FVa en una superficie aniónica y en presencia de calcio para formar el complejo protrombinasa, cuya función es activar a la protrombina, además es capaz de activar a FV, VII y FVIII.

2.5. Cofactores V, VIII y Factor Tisular

Los cofactores V y VIII presentan una elevada homología estructural (figura 13-4) y funcional. La figura 13-4 presenta la secuencia estructural de estas proteínas y su mecanismo de activación mediado por trombina. De modo general, la trombina activa a los Factores V y VIII, aunque también pueden ser activados por el factor Xa. Este proceso de activación como cofactores se expresa preferentemente luego de una proteólisis limitada por acción de trombina y consiste en la remoción del dominio B, de la molécula, formándose una cadena liviana y una pesada. Ambos factores activados se unen con gran afinidad a fosfatidilserina, translocada al exterior de la membrana de células activadas, especialmente las plaquetas mediante *scrambling*, ocurriendo una interacción a través de la cadena liviana compuesta por los dominios A3-C1-C2.

El factor VIIIa facilita la acción del factor IXa sobre el factor X, en el complejo tenasa mientras que el factor Va favorece la acción del factor Xa sobre la protrombina a través de la formación del complejo protrombinasa, reacciones que ocurren en presencia de calcio y fosfolípidos. Ambos factores V y VIII son consideradas proteínas lábiles, porque se inactivan y degradan con gran rapidez, y por la facilidad con que se pueden activar *in vitro*.

El **factor V** es sintetizado en los hepatocitos, en células del sistema fagocítico mononuclear y en megacariocitos. Corresponde a una glicoproteína de una cadena única (330 kDa), su concentración plasmática es de 5 a 10 µg/mL y su vida media es de 12 a 36 horas. El gen que codifica para el factor V humano está localizado en el cromosoma 1q21-25 y contiene 25 exones. La transcripción del gen resulta en un mRNA de 6,8 Kb, generando una proteína de 2224 aminoácidos que incluye un péptido señal de 28 aminoácidos. Estructuralmente tiene dominios A1-A2-B-A3-C1-C2, siendo el dominio C que media la unión del FV a la superficie fosfolipídica aniónica. El FV es activado por la trombina o el factor Xa. Mediante la activación mediada por trombina, la proteólisis ocurre en las posiciones de Arg709, Arg1018 y Arg1545. Así el dominio B se disocia, consiguiendo

pasar a su forma activada (FVa), formada por una cadena pesada (A1-A2) y una cadena ligera (A3-C1-C2) las cuales permanecen unidas mediante enlaces no covalentes asociados con iones de calcio (figura 13-5).

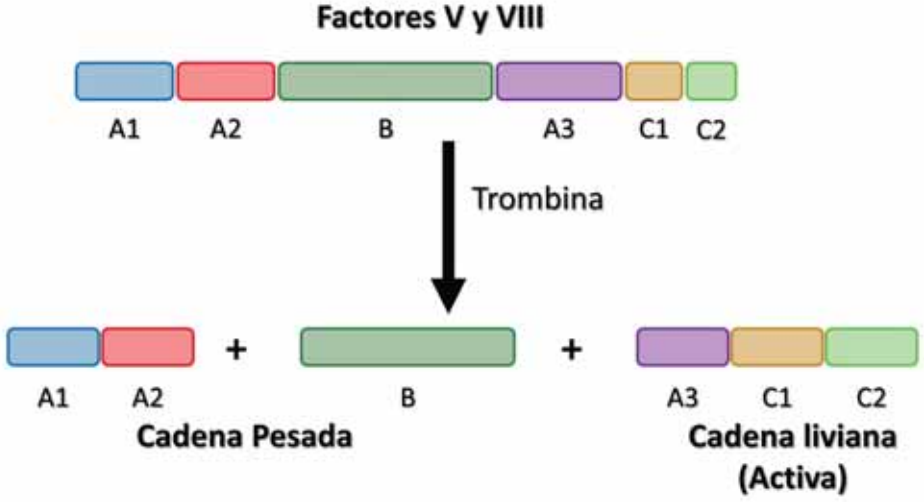


Figura 13-4. Secuencia estructural de los cofactores V y VIII, y mecanismo de activación mediado por trombina.

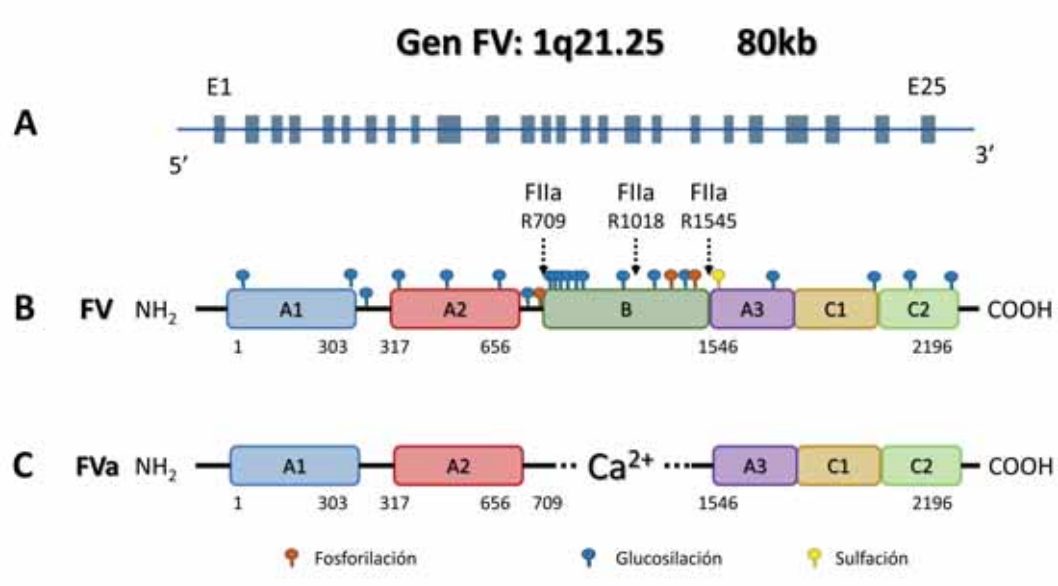


Figura 13-5. Estructura del gen y proteína del factor V humano. (A) Representación esquemática de la estructura exón-intrón del gen del FV, gen que contiene 25 exones, con una extensión aproximada de 80 Kb. (B) La organización estructural de la proteína establece que esta contiene 6 dominios y que una vez sintetizada sufre una serie de modificaciones postraduccionales. Finalmente, (C) representa la estructura del FVa, donde como consecuencia de la actividad proteolítica de la trombina sobre sitios de Arg, el Fva resulta en un heterodímero compuesto por una cadena pesada y una liviana unidos por un único ión calcio.

El 20 a 25% del FV se encuentra en los gránulos α de las plaquetas, quienes lo adquieren por endocitosis, y es secretado durante la activación de estas. El FV plaquetario sufre modificaciones intracelulares, por lo que es diferente al FV plasmático y está asociado a una proteína multimérica, llamada multimerina. Este factor es fisiológicamente significativo porque: (a) las plaquetas tienen sitios de unión para FVa en su membrana, (b) el ensamblaje del complejo protrombinasa se efectúa en la superficie de las membranas plaquetarias (fosfolípidos), y (c) la deficiencia de factor V se asocia a enfermedad hemorrágica.

Las deficiencias hereditarias de factor V se transmiten en forma autosómica recesiva y producen sangrado leve a moderado. La magnitud del sangrado no tiene correlación estricta con los niveles de factor en el plasma y se correlacionaría mejor con los niveles de factor V plaquetario. Los pacientes heterocigotos en general son asintomáticos. Estos pacientes pueden tener prolongación del TTPA, TP y tiempo de sangría y además pueden observarse deficiencias combinadas de V y VIII.

El **factor VIII** o factor antihemofílico corresponde a una proteína sintetizada en los hepatocitos, tejido esplénico y tejido linfoide. Es sintetizado como un preprocofactor de cadena simple y posteriormente sufre un procesamiento intracelular siendo secretado como heterodímero (300 kDa), cuya estructura heterodimérica es mantenida por calcio. Su concentración plasmática es de 0,2 µg/mL y su vida media es de 8 a 12 horas. En plasma es transportado por el factor von Willebrand (FvW) que es un multímero de alto peso molecular que promueve la asociación entre ambas cadenas del FVIII, además lo estabiliza y regula su actividad en el plasma. Del mismo modo el FvW protege al factor VIII plasmático de su degradación, por esta razón los pacientes portadores de enfermedad de von Willebrand cuantitativa (EvW tipo I ó tipo III) presentarían niveles más bajos de factor VIII. El FVIII está codificado en el cromosoma X (Xq28) y el gen posee 26 exones. Estructuralmente tiene 6 dominios: A1-A2-B-A3-C1-C2, compartiendo significativa homología de secuencia con el FV. El FVIII maduro está formado por una cadena pesada que incluye los dominios A1-A2-B (90-200 kDa) y una cadena liviana formada por los dominios A3-C1-C2 (80 kDa). La trombina y el FXa son los principales activadores del FVIII, realizando secuencialmente cortes proteolíticos en Arg740, Arg372 y Arg1689. El FVIIIa está formado por dominio A1 (50 kDa), A2 (43 kDa) y la cadena liviana compuesta por A3-C1-C2 (73 kDa) (figura 13-6). El factor VIIIa se libera del FvW pudiendo unirse a plaquetas activadas o superficies fosfolipídicas, promoviendo la activación del factor Xa. El factor VIIIa, a diferencia del factor VIII, pierde su capacidad para unirse al FvW.

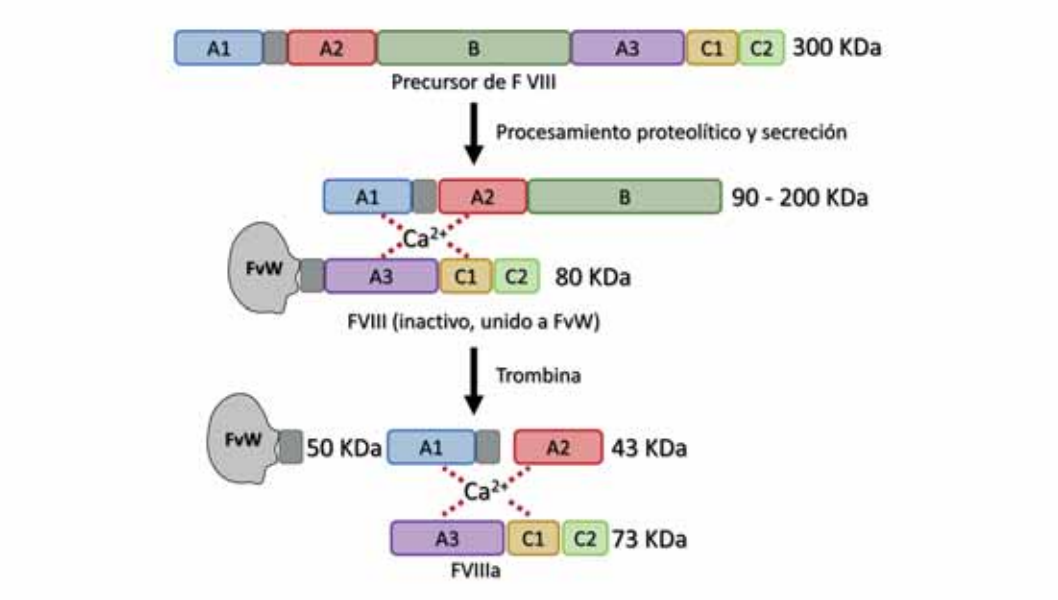


Figura 13-6. Estructura del factor VIII y su activación por trombina. FVW, Factor von Willebrand.

El **FT**, también conocido como tromboplastina o CD142, es una proteína transmembrana que se expresa en tejidos no vasculares, principalmente fibroblastos y células musculares lisas. Adicionalmente, células endoteliales y monocitos pueden expresar FT en respuesta a injuria o citoquinas. Actúa como receptor, y al mismo tiempo, como cofactor del factor VII. El gen que codifica el FT (*F3*) se encuentra localizado en el cromosoma 1p21-p22 y consiste en 6 exones y 5 intrones. Estructuralmente, el FT (47 kDa) está compuesto de 263 aminoácidos de los cuales 219 se localizan en el dominio extracelular, 23 en la porción transmembranal y 21 en el dominio intracelular (figura 13-7).

En muchos tejidos el FT forma complejo con fosfolípidos de membrana que aceleran la coagulación, ya que proveen sitios de unión para que los factores de la coagulación reaccionen sobre superficies celulares. El FT en condiciones normales no circula en el plasma, su expresión en superficie de monocitos y en células endoteliales puede ser inducida por lipopolisacáridos, bacterias y citoquinas inflamatorias. Su expresión intravascular puede contribuir al estado procoagulante asociado con inflamación o infección. La principal función del FT es formar complejo con el factor VII e iniciar la vía extrínseca de la coagulación.

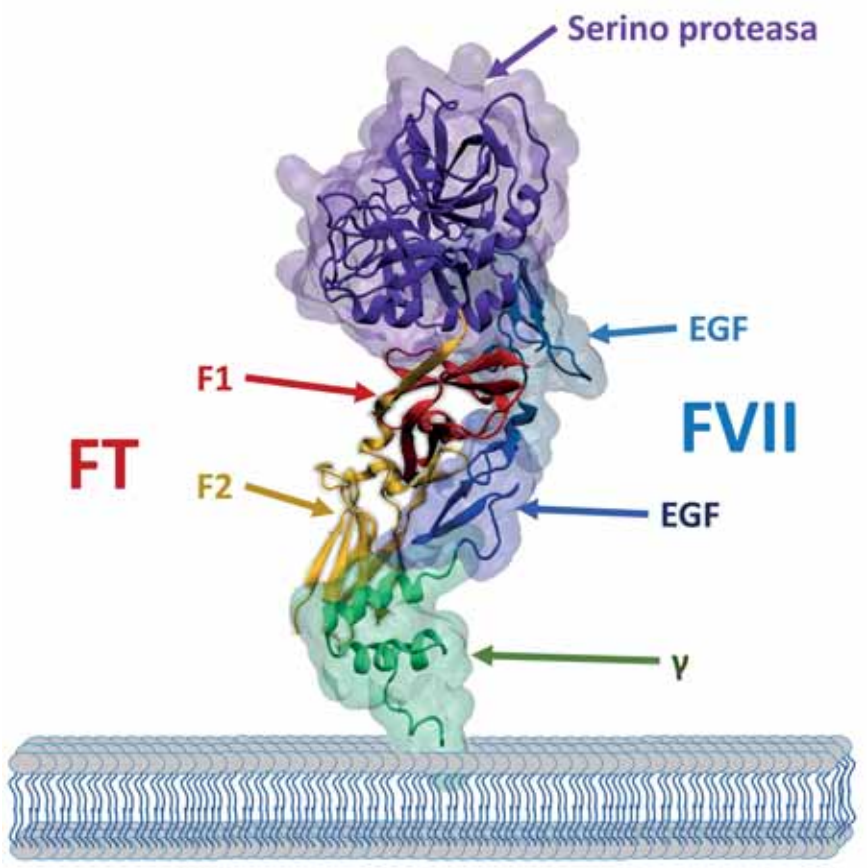


Figura 13-7. Estructura general del factor tisular y del factor VII. F1 y F2, dominios fibronectina tipo 3; EGF, Factor de crecimiento endotelial; γ, dominio Gla.

La expresión anormal del FT juega un papel importante en la actividad procoagulante observada en la coagulación intravascular diseminada, sepsis, cáncer, trombosis arterial, y otras patologías. Existe una asociación entre el FT y los procesos malignos, es así como el FT se ha relacionado con fenómenos de invasión y metástasis tumoral. Los eventos proteolíticos que se generan en el cáncer son dependientes de la expresión del FT, el cual se encarga de la formación de una cubierta de fibrina en la superficie de células malignas que ingresan a la circulación sanguínea después de desprenderse de un tumor primario. Esta cubierta de fibrina protege a las células tumorales circulantes de la actividad inmunológica del organismo hasta que se puedan adherir al endotelio de un lecho capilar y establecerse como una lesión metastásica.

Por su parte, en las lesiones ateromatosas el FT se localiza alrededor del centro necrótico rico en lípidos, por ello se postula que el colesterol LDL y los lípidos oxidados inducen la expresión del FT. Por otro lado, la proteína C reactiva, asociada a procesos inflamatorios, también induce la expresión del FT sobre las superficies celulares.

2.6. Complejos macromoleculares

En la secuencia de reacciones de la coagulación existen tres instancias en que se forman complejos esenciales en el proceso. Estos complejos macromoleculares se ensamblan sobre la superficie de células estimuladas que se ubican en los sitios de injuria vascular, por lo que la formación de estos complejos enzimáticos facilita la interacción entre sus componentes, acelerando y proporcionando relevancia fisiológica a las reacciones en que participan.

Complejo FT-FVII

Cuando se expresa el factor tisular sobre células activadas, se unen a este trazas de FVIIa presentes en la circulación formando el complejo FT-FVIIa, lo que constituye la primera etapa de la denominada vía extrínseca.

La capacidad catalítica del complejo FT-VIIa es 800 a 900 veces mayor que la actividad del factor VIIa en solución. El complejo FT-VIIa activa no solo al factor X, sino que también al factor IX (figura 13-8) y actualmente se establece que este complejo es el que inicia el proceso de la coagulación *in vivo*. De este modo, la activación del FIX por el FXI no parece estrictamente necesaria pues el complejo FT-VIIa actúa como puente entre la vía extrínseca y la vía intrínseca.

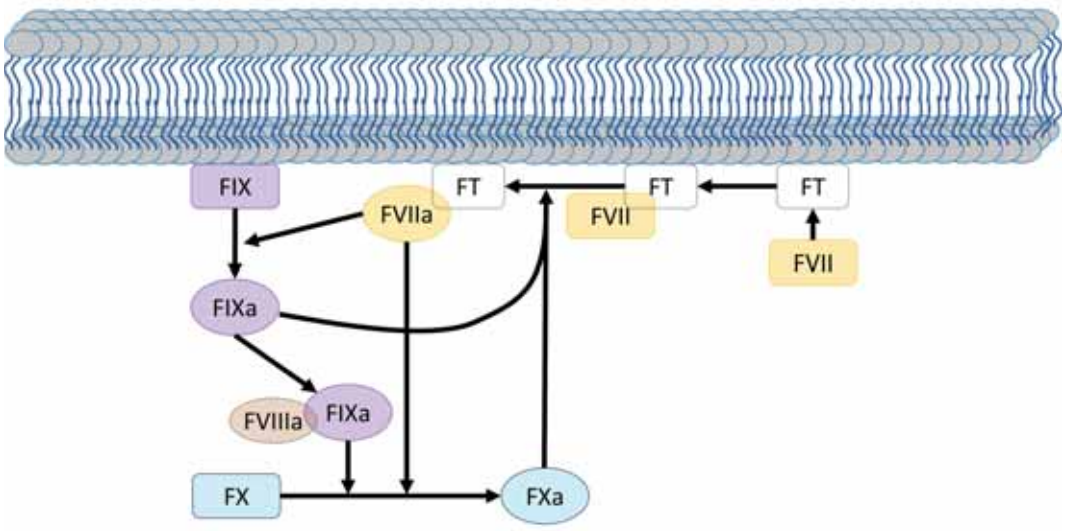


Figura 13-8. Función del FT en la activación de la coagulación. La expresión del FT en la superficie de algunas células y la formación de complejo con el factor VII inicia la vía extrínseca. Este complejo tiene la capacidad de activar tanto FX como así también FIX, permitiendo la generación inicial de trombina.

Complejo FIXa-FVIIIa

El complejo macromolecular formado por el factor IXa con su cofactor VIIIa es ensamblado sobre fosfolípidos de membrana en presencia de calcio y su principal función es la activación del factor X, de allí el nombre de complejo "tenasa".

La activación del factor IX es relativamente lenta en comparación con otras proteasas, no requiere de cofactores y puede efectuarse sobre las membranas celulares o en solución. El ensamblaje del complejo requiere la unión del factor VIIIa y del IXa a fosfolípidos aniónicos. La interacción de ambos induce un cambio conformacional del factor IXa que favorece la proteólisis parcial que ejerce el FXIa. En presencia de fosfolípidos y Ca^{2+}, la Vm de la activación del factor X por el IXa es 10.000 veces mayor en presencia de VIIIa que en su ausencia. La deficiencia congénita de factor IX se conoce como hemofilia B y tiene manifestaciones clínicas similares a la hemofilia A, aun cuando su prevalencia es menor.

Complejo protrombinasa

Este importante complejo macromolecular se encuentra formado por los factores Xa y Va (cofactor), y se forma sobre la superficie fosfolipídica en presencia de calcio (figura 13-9). El factor Va favorece que se produzca un cambio conformacional en el sitio activo del factor Xa lo que le permite interactuar en forma óptima sobre la protrombina para generar trombina. La velocidad de activación de la protrombina por el complejo protrombinasa es 300.000 veces mayor que por el factor Xa aislado.

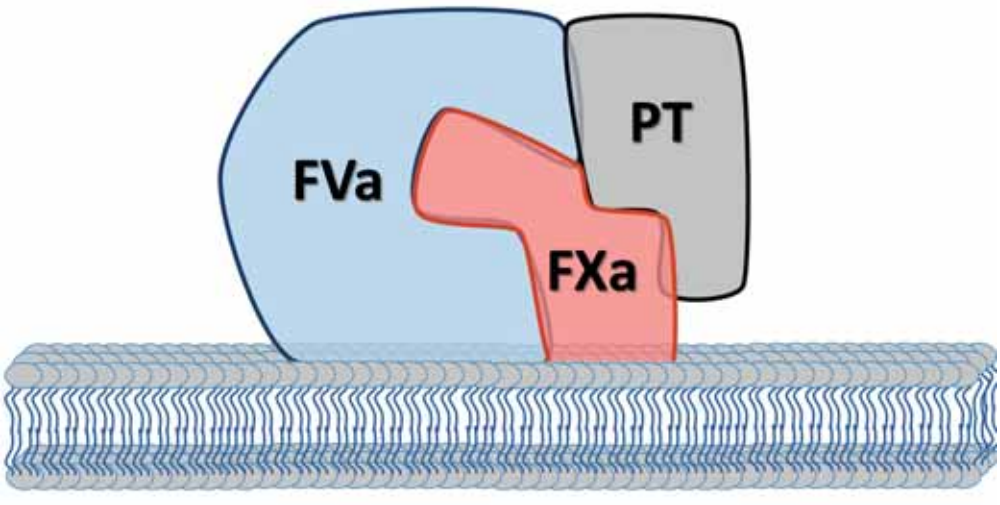


Figura 13-9. Modelo de activación de la protrombina por el complejo protrombinasa. La interacción de los residuos γ-carboxiglutámicos de los factores vitamina K dependientes Xa y protrombina facilita la exposición de los sitios de unión a membrana de estos factores. El cofactor Va unido a fosfatidilserina en las membranas celulares facilita el ensamblaje del complejo protrombinasa, actuando el factor Xa sobre la protrombina.

2.7. Fibrinógeno, formación de fibrina y FXIII

El **Fibrinógeno** es una proteína estructural sintetizada en el hígado que circula en el plasma en una concentración promedio de 2500 µg/mL y su vida media es de 72 a 120 hrs. Adicionalmente, también se encuentra en los gránulos α de las plaquetas, donde ingresa por endocitosis desde el plasma.

El fibrinógeno corresponde a una glicoproteína dimérica (340 kDa) compuesta por dos mitades idénticas, cada una compuesta por 3 cadenas peptídicas (Aα Bβ y γ), lo que se presenta en la figura 13-10. Los 16 aminoácidos del extremo amino-terminal de las cadenas Aα forman el fibrinopéptido A (FpA) y los 14 aminoácidos del extremo N-terminal de la cadena Bβ forman el fibrinopéptido B (FpB). La síntesis de las cadenas está codificada por 3 genes diferentes; luego de su ensamblaje y glicosilación de las cadenas Bβ y Aα, la molécula madura es secretada por las células del parénquima hepático a la circulación. Las dos mitades de la molécula, hacia el extremo amino-terminal de sus 3 cadenas están unidas por puentes disulfuro, y los extremos N-terminales de las 2 cadenas Aα y 2 cadenas γ están unidas entre sí por los mismos enlaces, lo que conforma un dominio central llamado E. Los extremos carboxi-terminales de los 3 pares de cadenas se extienden en sentido opuesto desde el dominio central, dando origen a 2 regiones periféricas denominados dominios D.

El fibrinógeno es una proteína reactante de fase aguda por tanto sus niveles plasmáticos pueden aumentar varias veces sobre el nivel normal en respuesta a la inflamación o a cuadros infecciosos agudos.

Diferentes trastornos genéticos pueden desencadenar hipofibrinogenemia, disfibrinogenemia o afibrinogenemia. Las manifestaciones clínicas pueden ser diversas como hemorragias, tendencia a trombosis, trastornos de la cicatrización o pueden cursar de forma asintomática. La alteración genética más frecuente es la disfibrinogenemia la que se transmite en forma autosómica dominante, por lo que al menos el 50% de los integrantes de una familia son sintomáticos. Desde el punto de vista del laboratorio, los pacientes presentan prolongación del tiempo de trombina, con niveles de fibrinógeno normal o disminuido según se trate de hipofibrinogenemia o disfibrinogenemia; mientras que pruebas globales de la hemostasia como TTPA y TP pueden estar discretamente prolongados.

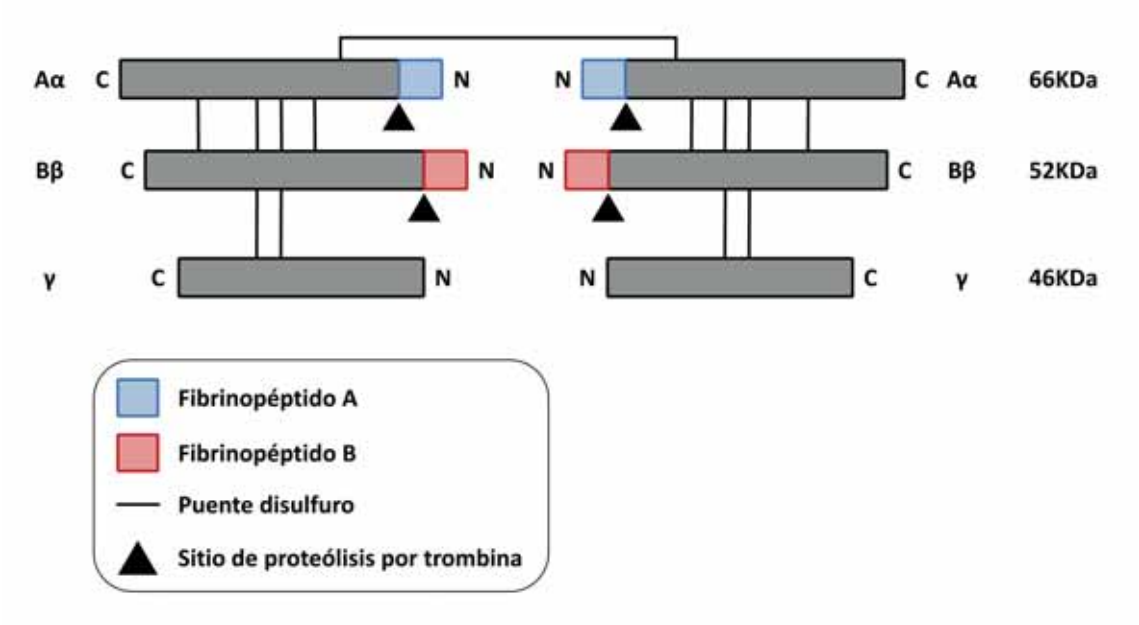


Figura 13-10. Estructura del fibrinógeno

Formación de la fibrina

La conversión del fibrinógeno soluble en un polímero insoluble de fibrina ocurre en tres etapas:

a) Acción de la trombina sobre el fibrinógeno, donde trombina rompe los enlaces Arg16-Gly17 de las cadenas Aα y Arg14-Gly15 de las cadenas Bβ liberando los dos FpA de los extremos N-terminales de las cadenas Aα, y los 2 FpB de las cadenas Bβ. La estructura restante, 2(α,β,γ), corresponde al monómero de fibrina.

b) Polimerización espontánea de los monómeros de fibrina mediante asociación no covalente. La pérdida de los FpA expone sitios de unión en el dominio E central de los monómeros, que interactúan con sitios complementarios de la cadena γ del dominio D de un monómero adyacente. La unión forma un dímero que es la unidad estructural básica de la malla de fibrina. Por otra parte, la pérdida del FpB expone sitios de unión en el dominio D que promueve el contacto D-D produciendo el crecimiento lateral de la malla (Figura 13-11).

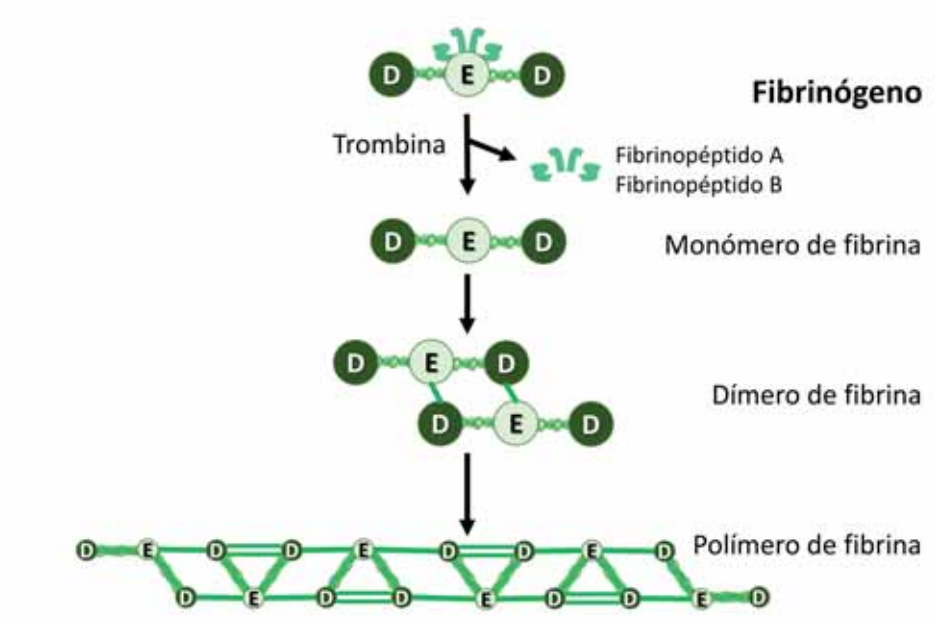


Figura 13-11. Polimerización de la fibrina.

c) Estabilización del coágulo por formación de enlaces covalentes entre grupos ε-amino de lisina y γ-carboxilo de glutamina. El enlace covalente que se forma entre moléculas adyacentes de fibrina ocurre por acción del factor XIIIa, una transglutaminasa (figura 13-12). Al comienzo estos enlaces covalentes se producen entre las cadenas γ en las zonas de unión D-D, estabilizando longitudinalmente el monómero de fibrina. Luego se extienden con entrecruzamientos progresivos que ligan una cadena α con 2 cadenas α de una cadena vecina aumentando notoriamente la rigidez. El coágulo adquiere resistencia, tanto a la ruptura mecánica como a la acción de la plasmina.

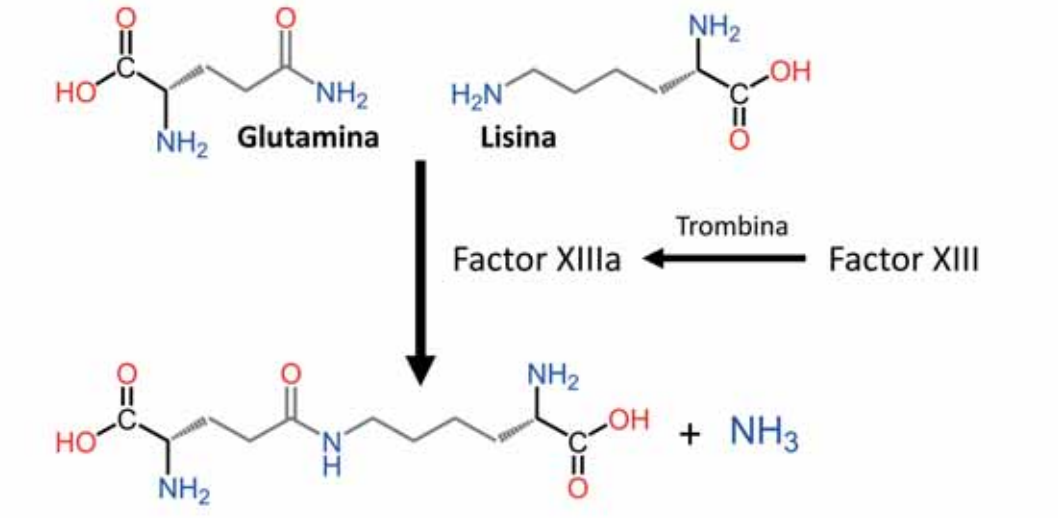


Figura 13-12. Actividad de transglutaminación del factor XIIIa.

El **factor XIII** corresponde a una transglutaminasa, siendo la única enzima de la coagulación que no es serino proteasa. Circula en plasma como un heterotetrámero (320 kDa) que consta de 2 subunidades FXIIIA y 2 subunidades FXIIIB, con una concentración plasmática de 30 µg/mL y una vida media de 240 horas. En plasma circula asociado a fibrinógeno por interacción de FXIIIB con cadena γ del fibrinógeno. La subunidad FXIIIA está codificada en el cromosoma 6 (6p25.1) y el gen que lo codifica tiene 15 exones, mientras que la subunidad FXIIIB está ubicado en el cromosoma 1 (1q31.3) y su gen tiene 12 exones. El FXIIIA se sintetiza en monocitos/macrófagos, megacariocitos y hepatocitos, mientras que el FXIIIB se sintetiza exclusivamente en el hígado y el riñón. Ambas subunidades se sintetizan y expresan separadamente, pero se ensamblan en circulación. Estructuralmente, la subunidad FXIIIA contiene un péptido de activación, un dominio β-sándwich, un dominio catalítico transglutaminasa y 2 dominio β-barril. La subunidad FXIIIB funciona como transportador y consta de 10 dominios sushi en tándem, donde los dos primeros dominios son esenciales para la unión con FXIIIA. La subunidad FXIIIA es una proenzima activada proteolíticamente por trombina mediante clivaje en Arg37, usando como cofactores al calcio y el fibrinógeno. Producto del clivaje realizado por trombina se libera el péptido de activación y se disocia de FXIIIB exponiendo su sitio activo.

En la tabla 13-2 se resumen las características estructurales, cinéticas y funcionales de los factores de la coagulación.

3. MODELOS DE LA COAGULACIÓN

3.1. Modelo clásico

La teoría clásica de la coagulación fue propuesta en 1905 por Paul Morawitz siendo resultado de una cuidadosa revisión de los conocimientos que había hasta ese momento. Esta teoría reúne los cuatro factores descubiertos hasta esa época: fibrinógeno, protrombina, calcio y factor tisular por lo que propone que la coagulación de la sangre ocurre en dos etapas. En la primera de ellas, la protrombina se convierte en trombina mediante la acción del factor tisular en presencia de calcio y en la segunda etapa el fibrinógeno se convierte en fibrina gracias a la acción de la trombina. Morawitz introdujo el término trombocinasa para designar a lo que hoy conocemos como factor tisular y prefería el nombre trombógeno para designar a la protrombina.

Tabla 13-2. Características de los factores de la coagulación

Factor	PM (kDa)	Sitio de síntesis	Concentración plasmática (µg/mL)	Nivel hemostático[1]	Vida Media (horas)
I	340	Hígado	2500	>50mg/dL	72 - 120
II	72	Hígado	100	15 – 25%	60
III	47	Fibroblastos, células musculares lisas, células endoteliales, monocitos	-	-	-
V	330	Hígado [2]	5 - 10	10 – 15%	12 - 36
VII	50	Hígado [2]	0,5	10 – 15%	3 - 6
VIII	300	Hígado	0,2	10 – 20%	8 - 12
IX	55	Hígado	5	10 – 20%	18 - 24
X	59	Hígado	10	>20%	34 - 40
XI	160	Hígado	5	10%	60 - 80
XII	80	Hígado	40	10 – 15%	50 -70
XIII	320	Subunidad XIIIA: monocitos, megacariocitos e hígado Subunidad XIIIB: Hígado y riñón	30	2 – 3%	240
PK	85	Hígado	40	[3]	35
HMWK	120	Hígado	80	[3]	150

[1] El porcentaje expresa la cantidad mínima del factor que permite una hemostasia adecuada en condiciones fisiológicas. Se considera que la actividad promedio normal para la población es de 100%.
[2] Los factores V y VII también se sintetizan en otros sitios.
[3] Su disminución no afecta la capacidad hemostática del organismo. Su disminución sí afecta las pruebas de la coagulación in vitro.

3.2. Modelo de la cascada de la coagulación

En 1964 se desarrolla la teoría de la cascada de la coagulación, basada en reacciones enzimáticas secuenciales en forma de cascada, término propuesto por Ratnoff, Davie y MacFarlane. En este modelo se describe el proceso de coagulación a través de la activación de 2 vías: la vía intrínseca y la vía extrínseca, que confluyen en una vía común en que se activa el factor X hasta formar fibrina a partir de fibrinógeno (figura 13-13).

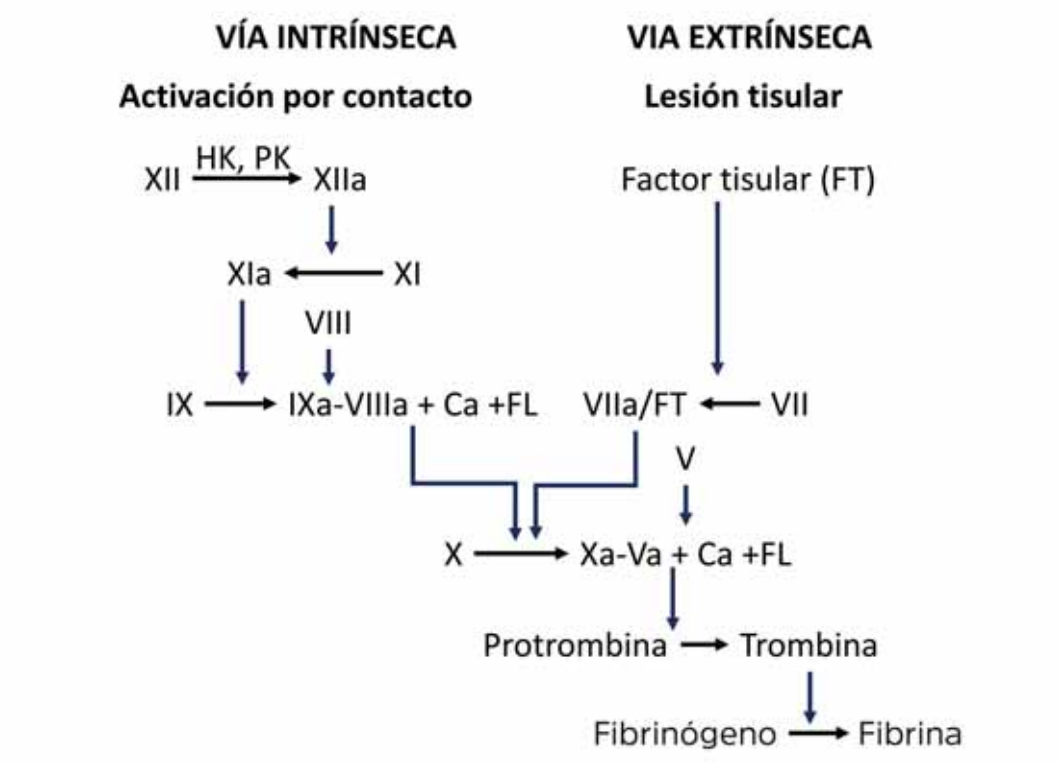


Figura 13-13. Modelo de la cascada de la coagulación.

La **vía intrínseca** se inicia con la activación del factor XII sobre superficies con carga negativa como proteínas de la matriz, una de ellas es el colágeno; en esta reacción interviene la calicreína y el cininógeno de alto peso molecular (HMWK) constituyendo el sistema de contacto. En condiciones *in vitro*, la superficie de activación o contacto corresponde al vidrio del tubo que contiene la sangre y se utilizan activadores como el kaolín, sílica y otros. Una vez activado el factor XIIa cataliza la conversión del factor XI (cininógeno) a XIa y en presencia de iones calcio el factor XIa activa al factor IX a IXa.

El factor IXa junto al VIIIa se unen a fosfolípidos de membrana y en presencia de calcio forman el "complejo tenasa" que transforma el FX a FXa. A partir de la activación del FX ambas vías continúan una vía común hasta la formación de fibrina. El factor Xa se une al factor Va sobre la superficie de una membrana fosfolipídica en presencia de calcio, generando el "complejo protrombinasa" que convierte la protrombina en trombina. Al romperse la protrombina se forma trombina y se libera un fragmento proteico de mayor tamaño que es el fragmento 1.2 de la protrombina.

El sustrato natural de la trombina es el fibrinógeno, generando fibrinopéptidos A y B y los monómeros de fibrina que posteriormente se polimerizan y forman un coágulo de fibrina estable. Inicialmente los monómeros de fibrina se entrelazan por uniones no covalentes, pero el factor XIIIa crea un coágulo estable.

La **vía extrínseca** comprende la participación del factor VII (proteína plasmática) y el factor tisular (cofactor), los cuales forman un complejo que se une a la superficie fosfolipídica por medio de puentes de calcio.

El complejo FT-FVIIa activa el factor X a factor Xa. Como antes se indicó a partir de la activación del FX la secuencia de reacciones es la misma que si la activación del sistema se iniciara por la vía intrínseca.

3.3. Modelo celular

Las vías fisiológicas que operan *in vivo* parecen ser diferentes a las descritas *in vitro*. Al respecto, algunos antecedentes son los siguientes: (a) los individuos con deficiencia de alguno de los factores de contacto (FXII, PK, HMWK) presentan alteración de las pruebas de la coagulación, pero no sufren hemorragias, a diferencia de lo que ocurre en la deficiencia de otros factores del sistema de la coagulación. Lo anterior indicaría que los factores de contacto no participan en el sistema de la coagulación *in vivo*, (b) el FT expresado en sitios vasculares en donde se ha producido una injuria, en monocitos estimulados y en las células endoteliales, es capaz de iniciar la coagulación, (c) el complejo FT-VIIa, no solo activa al factor X, sino que también al factor IX, estableciendo así un puente entre las denominadas vías intrínseca y extrínseca.

El modelo de coagulación actual o modelo celular (figura 13-14) se basa en la premisa de que para que ocurra una hemostasia eficaz deben cooperar diferentes tipos celulares. Las plaquetas otorgan una superficie de fosfolípidos aniónicos altamente eficiente para la generación de trombina como resultado del fenómeno de *scrambling*, sin embargo, carecen de FT y por ello no pueden iniciar la coagulación. Otras células expresan FT e incluso los monocitos pueden ensamblar en su superficie el complejo de activación del FX y al complejo protrombinasa. Por lo anterior, para generar trombina de forma eficiente se requiere de al menos 2 tipos celulares distintos. Este modelo propone que la coagulación ocurre en 3 fases: fase de iniciación, fase de amplificación y fase de propagación.

Fase de iniciación: comienza tras la exposición del FT, el cual se une FVIIa que circula en pequeñas cantidades y forman junto con iones calcio y fosfolípidos el complejo FT-FVIIa, que genera más FVIIa y activa a los factores X y IX. El FXa se une a una superficie fosfolipídica con el FVa (liberado de los gránulos plaquetarios o activado por el FXa u otras enzimas), para producir pequeñas cantidades de trombina, que no sirve para formar fibrina. Proteasas como el inhibidor de factor tisular (TFPI) y la inhibidora de antitrombina limitan la difusión.

Fase de amplificación: la trombina generada en la fase anterior favorece la activación de las plaquetas adheridas al colágeno subendotelial. La trombina también activa el FV, amplificando la actividad protrombinasa y al FVIII, el cual funciona como cofactor del FIXa para mantener la generación del FXa, así mismo la trombina activa al factor XI. La plaqueta contiene en estos momentos factores

activados además de factor de Von Willebrand en su superficie. En esta fase se lleva a cabo la activación de los anticoagulantes naturales: TFPI, antitrombina y sistema de la proteína C activada, importantes en la regulación procoagulante.

Fase de propagación: el FXIa activa al FIX, generando FIXa que se unirá al FVIIIa, sobre una superficie fosfolipídica y en presencia de iones de calcio, formando el complejo tenasa, generando grandes cantidades de FXa que junto a FVa, en una superficie celular y en presencia de iones de calcio, forman el complejo protrombinasa que activa a la protrombina y asegura la generación de grandes cantidades de trombina. Estas cantidades de trombina son suficientes para generar monómeros de fibrina, que luego se polimerizan y entrecruzan por acción del FXIIIa, lo que genera un coágulo de fibrina estable. Finalmente, la generación de trombina es atenuada y neutralizada por la acción de inhibidores como el sistema de la Proteína C activada (PCa), la antitrombina III y el inhibidor de la vía del Factor Tisular (por sus siglas en inglés TFPI).

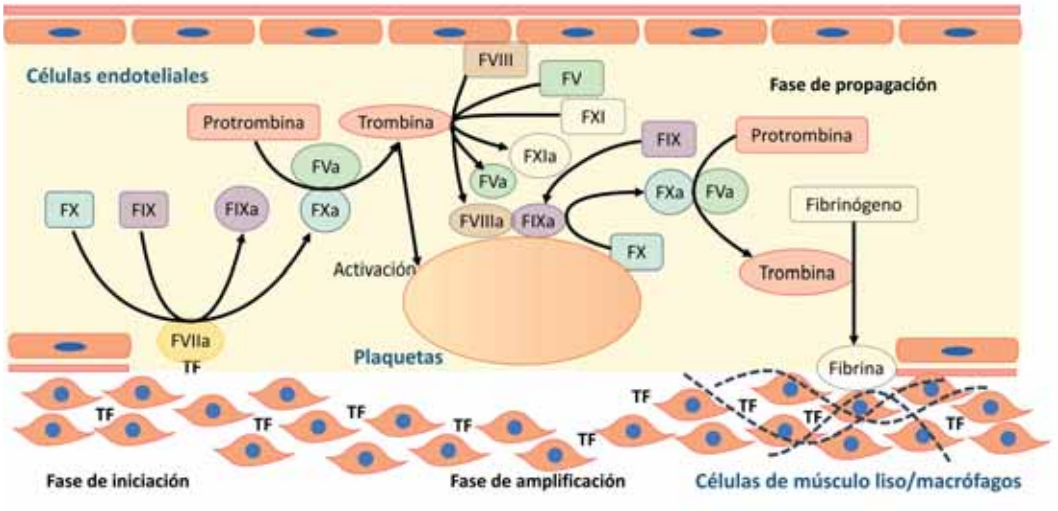


Figura 13-14. Modelo celular de la coagulación. Se inicia el proceso con la formación del complejo FT-FVIIa, que activa los factores IX y X generándose inicialmente pequeñas cantidades de trombina (fase de iniciación). La trombina activa los factores V, VIII y XI amplificando el proceso en plaquetas activadas (fase de amplificación). Finalmente el FXIa activa al factor IX que formará el complejo tenasa junto al factor VIIIa generando grandes cantidades de FXa que formará el complejo protrombinasa para generar grandes cantidades de trombina para formar fibrina (fase de propagación).

4. REGULACIÓN DEL SISTEMA DE LA COAGULACIÓN

La localización y la limitación del proceso hemostático a los sitios de daño vascular es la principal característica del sistema hemostático. Existen 4 sistemas anticoagulantes naturales: el Sistema Antitrombina III-Heparina, el Sistema de la proteína C, el Inhibidor de la Vía extrínseca (IVE), y el Inhibidor de proteasas dependiente de proteína Z.

4.1. Sistema antitrombina III

La antitrombina III (ATIII) es una glicoproteína que pertenece a la familia de las serpinas, es sintetizada en hígado y su concentración en plasma es 150 µg/mL. El gen que codifica para antitrombina III (*SERPINC1*) se encuentra en el cromosoma 1 (1q23-25) y presenta siete exones y seis intrones. Su función es neutralizar las proteasas de la coagulación (trombina, FIXa, FXa, FXIa y FXIIa) formando complejos con los factores activos.

La heparina acelera la inactivación de las proteasas en aproximadamente mil veces. La heparina y el heparán sulfato son polímeros heterogéneos formados por repetición de disacáridos con un grado variable de sulfatación (N-sulfatos y O-sulfatos). En el caso de la heparina, el disacárido más frecuente en su estructura está formado por ácido α-L- idurónico (2S) y N-sulfoglucosamina y en el caso de heparán sulfato el dímero más frecuente en su estructura está formado por ácido β-D-glucurónico y N-acetilglucosamina. En la sangre no existe heparina circulante, pero el endotelio vascular es rico en proteoglicanos con cadenas laterales de heparina/heparán que son necesarias para el reconocimiento por la ATIII. Esta proteína neutraliza las proteasas de la coagulación a través de la interacción de un sitio reactivo (arginina) y un centro activo (serina) (figura 13-15).

El sistema ATIII-heparina es el mecanismo principal de neutralización de los factores activados de la vía intrínseca. El factor VIIa y la proteína C activada son mínimamente inactivados por este sistema. Otras reacciones en que no participan serino proteasas no son afectadas por el sistema ATIII-heparina.

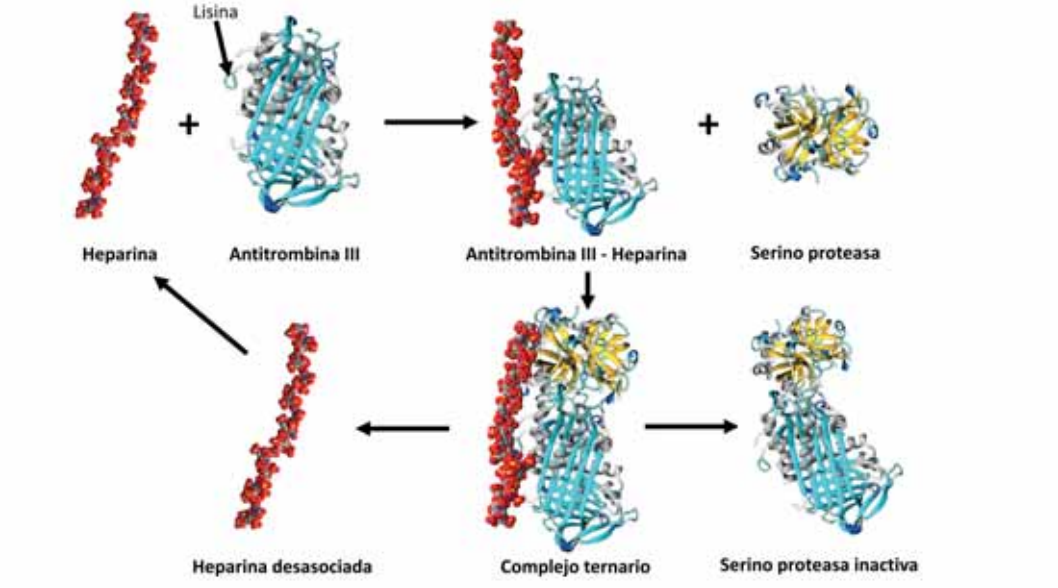


Figura 13-15. Inhibición de serino proteasas por la antitrombina III en presencia de heparina. La ATIII neutraliza las proteasas de la coagulación (ej. trombina) formando un complejo 1:1 con ellas. La unión de heparina a los residuos de lisina de la ATIII induce un cambio conformacional de la molécula, aumentando alrededor de 1.000 veces la velocidad de formación del complejo.

4.2. Sistema de la proteína C

El sistema proteína C inhibe dos cofactores: el factor Va y el factor VIIIa. Este sistema está constituido por la proteína C, receptor endotelial de la proteína C (EPCR), la proteína S y la trombomodulina.

La **proteína C** corresponde a una glicoproteína dependiente de vitamina K, sintetizada en el hígado como precursor de 461 aminoácidos. La proteína madura tiene 419 aminoácidos (62 kDa) y la mayoría es clivada en sitio Lys156-Ar157 por una endoproteasa, generando un zimógeno de dos cadenas (liviana y pesada unidas por puente disulfuro) que circula a una concentración de 4 µg/mL. El gen de la proteína C (*PROC*) se encuentra en el cromosoma 2 (2q14-21) y tiene 9 exones y ocho intrones.

El **EPCR** es una proteína transmembrana de 46 kDa expresada en las células endoteliales, homóloga a las moléculas CD1/MHC-1. Une la PC a través de los dominios Gla y contribuye a la activación de la proteína. También une a PCa con similar afinidad a PC. Está codificada en el cromosoma 20 (20q11.2) y su gen (*Procr*) tiene 4 exones y 3 intrones. El EPCR mejora en 5 veces la tasa de activación de PC por el complejo trombina-trombomodulina.

La **proteína S**, es llamada así por haber sido descubierta en Seattle. Es la única proteína dependiente de vitamina K que no es una enzima, sino que es un cofactor de la proteína C activada. Es sintetizada en hígado, riñón, testículos, megacariocitos y células endoteliales, siendo encontrada además en gránulos α de plaquetas. Corresponde a una proteína de cadena única de 75 kDa, codificada en el cromosoma 3 (3p11.1-11.2), cuyo gen tiene 15 exones y 14 intrones. En su estructura se distinguen 4 dominios: (a) dominio Gla que contiene 12 residuos de ácido γ carboxiglutámico, (b) una región sensible a la trombina, (c) cuatro dominios tipo factor de crecimiento epidérmico y (d) una región carboxilo-terminal distinta a otros factores vitamina K dependiente; que participa en la interacción con la C4bBP (proteína de unión de C4b). En el plasma la proteína S circula en dos formas, 40% en forma libre y 60% unida a la C4bBP.

La **trombomodulina** es una glicoproteína transmembrana (60 – 105 kDa) descubierta en células endoteliales que une específicamente trombina y actúa como cofactor para la activación de la proteína C por trombina. Está codificada en el cromosoma 20 (20p11.2) y su gen carece de intrones. Estructuralmente tiene cinco dominios: 1) un dominio aminoterminal formado por un residuo de lecitina orientado hacia la luz vascular, 2) seis estructuras homólogas al factor de crecimiento epidérmico (EGF), 3) Dominio rico en serina y treonina, 4) Dominio o región transmembrana y 5) Dominio citoplasmático.

Para que la proteína C cumpla su función anticoagulante debe ser activada (PCa) sobre la superficie de las células endoteliales, donde se forma un complejo reversible de alta afinidad entre la trombina y la trombomodulina. Este complejo activa a la proteína C, mediante corte proteolítico en Arg169-Leuc170, disociándose rápi-

damente la PCa de este complejo (figura 13-16). Posteriormente, la PCa ejercerá su acción inhibitoria sobre los factores Va y VIIIa a través de cortes proteolíticos. En el caso del Factor Va, se produce una proteólisis en tres sitios de la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la proteína: Arg 506, Arg 306 y Arg 679. En este sentido, la posición Arg 506 constituye el principal sitio de clivaje por medio del cual se produce la inhibición de más del 50% de la actividad procoagulante del factor V activado, facilitando y acelerando el posterior clivaje en la posición Arg 306 y Arg 679. En el caso del factor VIIIa ocurre en Arg 336 y Arg 562. En la figura 13-17 se muestra, esquemáticamente, la acción inhibitoria de la PCa.

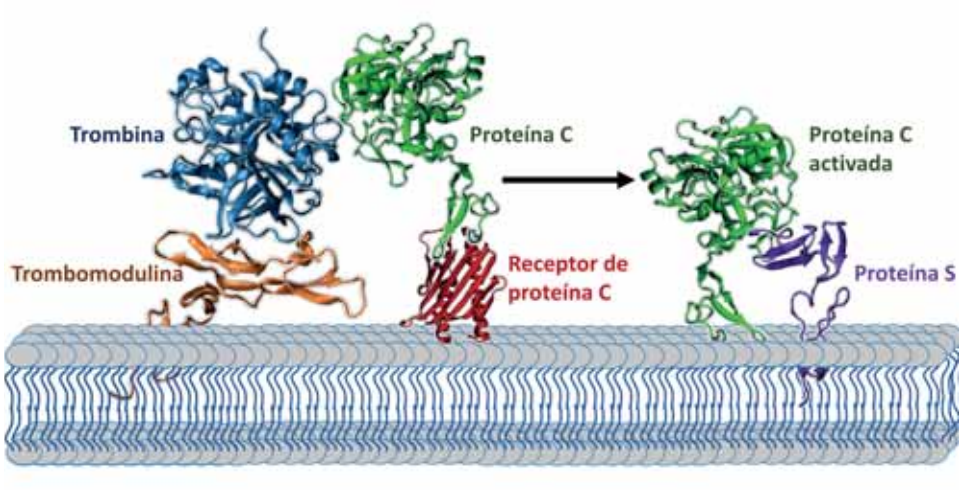


Figura 13-16. Mecanismo de activación de la proteína C (PC). La formación de un complejo entre la trombina y la trombomodulina (TM) induce un cambio conformacional de la trombina. Este complejo reconoce la conformación estabilizada de la proteína C, la cual de esta forma es activada (Pca). Esta proteína actúa con su cofactor, la proteína S (PS).

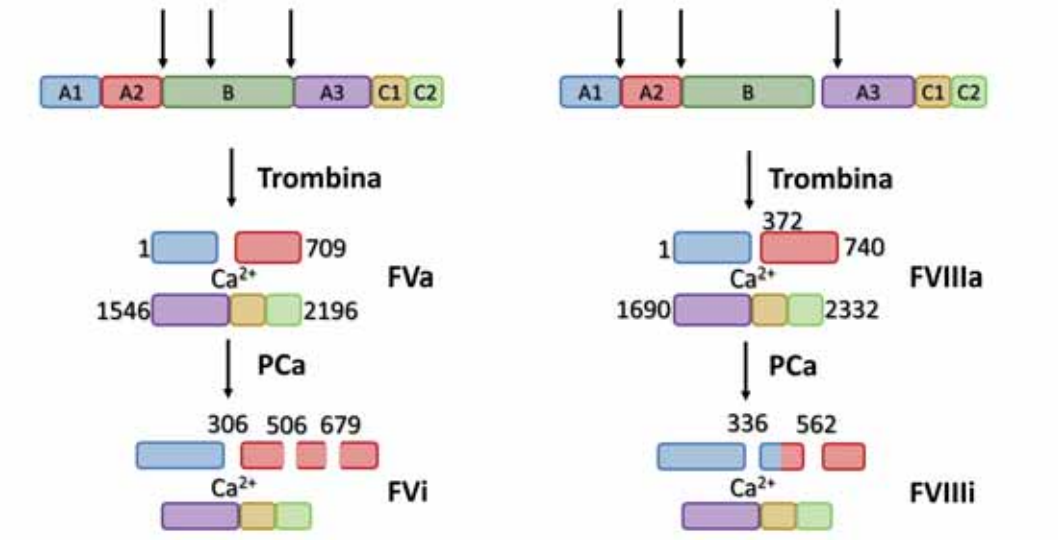


Figura 13-17. Inactivación de los factores Va y VIIIa por la proteína C (PCa)

4.3. Inhibidor de la vía extrínseca

La regulación del complejo macromolecular factor VII-FT, está mediada por el Inhibidor de la vía extrínseca (IVE), en inglés *tissue factor pathway inhibitor* (TFPI). El TFPI tiene dos isoformas α y β producidas por *splicing* alternativo, la primera se encuentra en plasma y la segunda en membrana de células endoteliales. Las células endoteliales son su principal fuente, pero también es sintetizado por megacariocitos y células musculares lisas. Las plaquetas contienen el 8% del TFPI de la sangre en gránulos distintos a los α y en lisosomas; el TFPI es secretado durante la activación plaquetaria. En el plasma aproximadamente el 50% se encuentra asociado a lipoproteínas.

El TFPIα es una molécula cargada negativamente en su extremo amino terminal, seguida por tres dominios inhibitorios tipo Kunitz y un extremo carboxilo-terminal cargado positivamente. El TFPIβ tiene los dos primeros dominios Kunitz, pero una secuencia no relacionada reemplaza el tercer dominio Kunitz y el extremo carboxiterminal cargado positivamente. El gen del TFPI se encuentra en cromosoma 2 (2q31-32.1) y tiene 9 exones.

El complejo factor VII-FT puede ser inhibido solo después que se ha iniciado el proceso de la coagulación. La reacción de inhibición requiere la presencia del factor Xa, que es el producto directo de la reacción del FVII-FT sobre sus sustratos. El TFPI no es miembro de las serpinas sino que pertenece a un grupo de inhibidores de serino proteasas tipo Kunitz.

La inhibición ocurre en 2 etapas: (a) el TFPI se une al FXa en presencia de calcio en una reacción que requiere el sitio activo del FXa, y (b) el complejo TFPI-FXa se une al FXa-FT por un mecanismo que necesita FXa en su conformación dependiente de calcio. En este paso el complejo TFPI-FXa actúa uniéndose al factor VIIa-FT en una conformación que permite que un segundo dominio inhibitorio del TFPI interactúe con el FVIIa.

4.4. Inhibidor de proteasas dependiente de proteína Z

La proteína Z (PZ) corresponde a una proteína vitamina K dependiente (62 kDa). Su organización génica en el cromosoma 13 y su estructura molecular son muy similares a los factores VII, IX, X, y proteína C, pero en contraste a estos, la típica tríada de activación (histidina, serina, ácido aspártico) está ausente, por lo tanto, la PZ no tiene función proteolítica (serino proteasa). En su extremo amino terminal posee un dominio rico en ácido γ-carboxiglutámico que le sirve a la proteína para interactuar con las membranas celulares en presencia de calcio, que al mismo tiempo sirve como cofactor para la inhibición del factor Xa por el Inhibidor de proteasas dependiente de proteína Z (ZPI).

La PZ humana tiene una vida media de 2,5 días y su concentración normal en el plasma va desde 1,9 a 3,9 μg/mL. Como otros factores vitamina K dependiente, los niveles de PZ en pacientes con tratamiento cumarínico y en recién nacidos son menores.

La actividad procoagulante del factor Xa es inhibida en presencia de PZ. Esta inhibición es mediada por otra proteína, el inhibidor de proteasas dependiente de proteína Z (ZPI) que circula en el plasma formando complejos con PZ. Ambas son sintetizadas mayoritariamente en el hígado y están codificadas en el cromosoma 13.

El ZPI es una glicoproteína (72 kDa) de cadena única que pertenece a la superfamilia de las serpinas, inhibidoras de serino proteasas. En presencia de PZ y de calcio iónico inhibe rápidamente el factor Xa sobre superficies celulares en presencia de calcio. Para esto se han descrito dos vías: (a) La PZ y el factor Xa formarían un complejo en la superficie fosfolipídica que luego sería reconocido por ZPI, y (b) la PZ y ZPI formarían un complejo en circulación que luego se uniría al factor Xa adosado a la superficie fosfolipídica. El resultado final de cualquiera de las dos vías es la formación de un complejo dependiente de calcio que contiene PZ, factor Xa y ZPI. La inhibición por parte del sistema ZPI se produce antes de la formación del complejo protrombinasa (FXa-FVa).

El factor XIa es inactivado por ZPI en una reacción que no requiere la presencia de PZ, fosfolípidos o calcio, y además no es afectada por la presencia de HMWK. La heparina aumenta esta inhibición y la prolonga en el tiempo. Aunque la relevancia de esta inhibición es incierta, aparentemente el ZPI compite con otros inhibidores del factor XIa y también bloquea la activación del factor IX que luego formaría parte del complejo "tenasa".

5. VARIACIONES FISIOLÓGICAS DE FACTORES DE COAGULACIÓN

5.1. Variaciones de factores de coagulación en neonatos y niños

Hacia fines de la década de 1980 fue acuñado el término “Hemostasia del desarrollo” por el Dr. Maureen Andrew el cual da cuenta de que el sistema hemostático es dinámico y evoluciona a lo largo de la vida, siendo en la infancia donde los cambios son más marcados.

Los factores de coagulación, por su tamaño, no atraviesan la placenta. Estos son producidos en el hígado del feto alrededor de la semana 11. Se ha reportado que niveles de la mayoría de los factores de coagulación son más bajos en bebés prematuros en comparación con recién nacidos de término y en los recién nacidos de término son más bajos que niños mayores y adultos. En los recién nacidos de término, los niveles de los factores vitamina K dependientes, son aproximadamente un 50% comparado con los niveles que tienen los adultos, pero a los 6 meses prácticamente han igualado el nivel (80%). Los recién nacidos prematuros (24 a 29 semanas de gestación), tienen menor nivel de factores vitamina K dependiente, esto es un 30% aproximadamente comparado con adultos. Algunos factores se encuentran en la misma cantidad de recién nacidos y adultos, por ejemplo, el FVIII, FXIII y fibrinógeno. Tomando en cuenta las diferencias mencionadas, diversos estudios han logrado establecer intervalos de referencia diferenciados en las pruebas globales de coagulación (TP y TTPA) para los recién nacidos y niños.

Se estima que aproximadamente el 30% de los resultados de TTPA en niños de 1 a 5 años pueden ser erróneamente interpretados como anormales si se considera un intervalo de referencia para población adulta, lo que tiene un impacto desde el punto de vista de los tiempos y costos asociados a estudios posteriores. Además, diversos autores demuestran cambios en los resultados de TTPA por edad de acuerdo con el tipo de reactivo utilizado, siendo un factor clave en laboratorios que informan pruebas de hemostasia en población pediátrica. A partir de lo anterior, la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia a través del Comité de Estandarización recomienda para laboratorios que procesan este tipo de muestras pediátricas, establecer intervalos de referencia para población pediátrica considerando analizadores y reactivos utilizados. Respecto de dichos intervalos, la recomendación es estandarizar por grupos: 1- 12 meses; 1 -5 años; 6-10 años y de 11-16 años.

5.2. Variaciones de factores de coagulación en embarazo

Los cambios observados durante la gestación tienen relación con que las mujeres embarazadas se encuentran en un estado de hipercoagulabilidad, producto de los cambios que se producen en las plaquetas, coagulación y fibrinólisis, para evitar hemorragias al momento del parto. Respecto al sistema de coagulación, se ha visto un incremento de la generación de trombina endógena, resistencia adquirida a la proteína C activada, leve disminución del TTPA y aumento en el nivel de complejo de protrombina (INR menor a 0,9). Si se evalúa a una mujer al final de su embarazo, se observará que las concentraciones de la mayoría de los factores de la coagulación aumentan al doble de los niveles vistos en mujeres no embarazadas. El factor XI es el único factor de la coagulación que disminuye. En cuanto a los anticoagulantes naturales, se ha reportado disminución de proteína S, aumento de TFPI y aumento de trombomodulina. Cuando ocurre el parto, los factores de la coagulación son consumidos. Al cabo de 4 a 6 semanas post parto, los cambios en la hemostasia se normalizan.

6. EL SISTEMA DE COAGULACIÓN Y SU RELACIÓN CON LA RESPUESTA INMUNE

Se cree que el sistema de coagulación y el sistema inmunológico de los organismos superiores tienen un origen ancestral común. En el transcurso de las infecciones el sistema de coagulación se activa lo que es beneficioso en las infecciones por bacterias y virus al limitar la diseminación, apoyar en la eliminación de los patógenos y participar en la reparación de tejidos.

Una forma en que se relacionan ambos sistemas tiene relación con que algunas proteasas de la coagulación pueden activar señalización celular mediante el clivaje de receptores activados por proteasas (PARs). El complejo FT-VIIa y FXa activan PAR2 y trombina puede activar a PAR1, PAR3 y PAR4. Se ha reportado que PARs modulan la respuesta inmune innata principalmente modulando señalización de receptores tipo toll, por ejemplo, señalización TLR4 antibacteriana es mejorada por PAR2.

Por otro lado, diferentes patógenos pueden activar la coagulación y ello parece ser un mecanismo de defensa para limitar la propagación de los microorganismos que quedan atrapados en el coágulo de fibrina. Además, la misma fibrina sirve para unir los leucocitos que migran al sitio de la infección y al mismo tiempo estos leucocitos también pueden potenciar la coagulación a través de la expresión de FT en el caso de monocitos o a través de la liberación de trampas extracelulares de neutrófilos (NET) por parte de neutrófilos que favorecen la activación de factores de la vía intrínseca. Adicionalmente, se ha reportado que componentes del sistema del complemento colaboran en activar la coagulación.

Por lo anterior, hoy en día se acepta que ambos sistemas, inmune y coagulación, están interrelacionados y se requiere la activación de coagulación para una eficaz respuesta inmune. Sin embargo, una sobreactivación de la coagulación puede llevar a trombosis, teniendo en ese caso efectos perjudiciales.

7. LECTURAS SUGERIDAS

Winter WE, Greene DN, Beal SG, Isom JA, Manning H, Wilkerson G, Harris N. Clotting factors: Clinical biochemistry and their roles as plasma enzymes. *Adv Clin Chem*. 2020. 94:31-84.

Smith SA, Travers RJ, Morrissey JH. How it all starts: Initiation of the clotting cascade. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2015. 50(4):326-336.

Versteeg HH, Heemskerk JW, Levi M, Reitsma PH. New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev*. 2013. 93(1):327-58.

Lippi G, Favaloro EJ, Franchini M, Guidi GC. Milestones and perspectives in coagulation and hemostasis. *Semin Thromb Hemost.* 2009. 35(1):9-22.

Dickneite G, Herwald H, Korte W, Allanore Y, Denton CP, Matucci Cerinic M. Coagulation factor XIII: a multifunctional transglutaminase with clinical potential in a range of conditions. *Thromb Haemost.* 2015 Apr;113(4):686-97.

Davenport P, Sola-Visner M. Hemostatic Challenges in Neonates. *Front Pediatr*. 2021. 9:627715.

Monagle P, Ignjatovic V, Savoia H. Hemostasis in neonates and children: pitfalls and dilemmas. *Blood Rev.* 2010. 24(2):63-8.

Ignjatovic V, Kenet G, Monagle P. On behalf of the Perinatal and Paediatric Haemostasis Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Developmental hemostasis: recommendations for laboratories reporting pediatric samples. *J Thromb Haemost.* 2012; 10: 298–300.

Uchikova EH, Ledjev II. Changes in haemostasis during normal pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2005. 119(2):185-8.

Delvaeye M, Conway EM. Coagulation and innate immune responses: can we view them separately?. *Blood.* 2009. 114(12):2367-74.

Esmon CT, Xu J, Lupu F. Innate immunity and coagulation. *J Thromb Haemost.* 2011. 9(Suppl 1):182–188.

Antoniak S. The coagulation system in host defense. *Res Pract Thromb Haemost.* 2018. 24. 2(3):549-557.

Capítulo

14

SISTEMA FIBRINOLÍTICO

Neftalí Guzmán O., Simón Navarrete, Eduardo Fuentes e Iván Palomo G

Resumen
1. **Introducción**
2. **Componentes del Sistema Fibrinolítico**
   2.1. Plasminógeno (PLG)
   2.2. Activadores del plasminógeno
   2.3. Plasmina y actividad fibrinolítica
3. **Regulación de la fibrinólisis**
   3.1. Alfa 2 antiplasmina (α2-AP)
   3.2. Inhibidor del Activador del Plasminógeno (PAI-1 y PAI-2)
   3.3. Inhibidor de la Fibrinólisis Activado por Trombina (TAFI)
4. **Rol de células y sus receptores en la fibrinólisis**
5. **Alteraciones del sistema fibrinolítico**
   5.1 Variaciones fisiológicas de proteínas de la fibrinólisis
   5.2 Alteraciones de la fibrinólisis
   5.3 Alteraciones de la fibrinólisis en COVID-19
6. **Lecturas sugeridas**

RESUMEN

La hemostasia sanguínea corresponde a una serie de complejos eventos celulares y bioquímicos que se encuentran altamente regulados. Estas reacciones implican la activación de precursores inactivos sobre los que actúan una serie de proteínas con actividad proteolítica y que permiten que dichos precursores sean transformados a su forma activa. Dentro de estos eventos, la fibrinólisis corresponde a un proceso enzimático que ocurre sobre la superficie de la célula endotelial y la fibrina generando la disolución del fibrinógeno y fibrina para recanalizar el vaso y facilitar su reparación.

Este capítulo aborda la importancia del sistema fibrinolítico, profundizando en sus componentes y mecanismos claves en su regulación. Además, a partir de la científica evidencia acumulada releva el rol de diversas células y sus receptores en el proceso y finalmente repasa las alteraciones clínicas asociadas a hiperfibrinólisis o hipofibrinólisis, considerando además las alteraciones de la fibrinólisis, descritas en COVID-19.

1. INTRODUCCIÓN

En respuesta a una injuria vascular, una serie de procesos que tienen como fin detener la hemorragia son activados. Inicialmente, participan los vasos sanguíneos y fenómenos de vasoconstricción, seguidos por la activación de plaquetas y agregación en el sitio de la injuria (hemostasia primaria). Finalmente, la activación de la cascada de coagulación (hemostasia secundaria) que genera el depósito de fibrina sobre las plaquetas, produciendo un coágulo estable que frena el sangramiento. Para evitar que el coágulo crezca descontroladamente, se activa la fibrinólisis, proceso enzimático compuesto por una serie de activadores e inhibidores, que regulan la conversión de la proenzima circulante, plasminógeno en la enzima activa plasmina, generando la lisis de la fibrina y dando lugar a los productos de degradación de la fibrina.

El proceso de la fibrinólisis se encuentra sujeta a un control preciso, por lo que desbalances como el incremento de su actividad favorece la aparición de trastornos hemorrágicos, mientras que el déficit de la actividad fibrinolítica puede predisponer a la trombosis.

2. COMPONENTES DEL SISTEMA FIBRINOLÍTICO

El sistema fibrinolítico se encuentra conformado por un zimógeno inactivo (plasminógeno), proteínas activadoras, además de inhibidores de la fibrinólisis. La tabla 1 resume los distintos componentes que participan en este proceso.

Tabla 14-1. Componentes del sistema fibrinolítico

COMPONENTE	UBICACIÓN CROMOSÓMICA	SÍNTESIS	VIDA MEDIA	FUNCIÓN
Zimógeno inactivo				
Plasminógeno (PLG)	6q26	Hepatocito	2 días	Proenzima de cadena simple, precursor inactivo de la fibrinólisis
Proteínas activadoras				
Activador del Plasminógeno tisular (tPA)	8q11	Célula endotelial	5 minutos	Principal activador endógeno del PLG
Activador del Plasminógeno urokinasa (uPA)	10q26	Célula endotelial Célula de epitelio renal Macrófago	8 minutos	Segundo activador endógeno de PLG
Inhibidores				
Alfa2-antiplasmina (α2-AP)	18q21– 22	Hepatocito	3 días	Inhibe a plasmina por formación de complejo Plasmina/α2-AP
Inhibidor del Activador del Plasminógeno tipo 1 (PAI-1)	7q21	Monocito Macrófago Célula endotelial Hepatocito Adipocito Megacariocito Plaquetas	1-2 horas	Inhibe activadores del plasminógeno (tPA y uPA)
Inhibidor del Activador del Plasminógeno tipo 2 (PAI-2)	18q21	Placenta Macrófago Keratinocito Adipocito	1-2 horas	Inhibe activadores del plasminógeno, inhibe eficientemente a uPA pero es pobre su acción sobre tPA
Inhibidor de la fibrinólisis activado por trombina (TAFI)	13q14.11	Megacariocito Hepatocito	15 minutos	Clivaje de residuos de arginina y lisina de la región C-terminal de la fibrina

2.1 Plasminógeno (PLG)

El plasminógeno es una proenzima de cadena simple de 92 kDa, de síntesis hepática, que presenta una concentración plasmática de aproximadamente 2 µM y una vida media de 2 días. El gen que lo codifica se encuentra ubicado en el cromosoma 6q26 y contiene 19 exones, mientras que la proteína circulante presenta 791 aminoácidos. Posteriormente a su síntesis, una serie de modificaciones postraduccionales resultan en dos isoenzimas (tipo 1 y tipo 2), basadas en su estado de glicosilación. Si bien estas variantes presentan similitud de secuencia, se diferencian en los sitios de glicosilación y en su concentración circulante, siendo esta porción de carbohidratos particularmente importante para regular la unión de plasminógeno a superficies celulares, así como en la activación de plasminógeno sobre fibrina.

Evidencia basada en el estudio cristalográfico de plasminógeno muestra que esta glicoproteína presenta un dominio denominado péptido amino terminal (PAp) ubicado en la posición 1-77 de la estructura aminoacídica, 5 dominios con estructura en forma de asa denominados *"Kringle"* (posición 78-542), además de un dominio serino proteasa (posición 562-791). Respecto de su función, el dominio PAp tiene un rol central en la regulación de actividad de plasmina, mientras que los dominios *kringle* presentan secuencias de consenso para unión a residuos de lisina C-terminal, mediando estos dominios de unión a lisina la interacción específica con fibrina y a receptores presentes en la superficie celular.

2.2 Activadores del plasminógeno

La activación de plasminógeno se produce a través de un clivaje del enlace Arg-Val en la posición 560-561 en la región C-terminal de la cadena de aminoácidos de la proteína. Este clivaje expone la tríada catalítica H603, Asp646 y Ser741 en el dominio serino proteasa, generando una molécula de plasmina bicatenaria conformada por dos cadenas unidas por puentes disulfuro. Lo anterior ocurre de manera fisiológica por acción de proteínas (serino-proteasas) como el activador del plasminógeno tisular (tPA) y tipo urokinasa (uPA). Este mecanismo igualmente puede ser gatillado por acción de activadores exógenos (terapéuticos). Además, existen algunos potenciadores de estos activadores como son las proteínas de la matriz extracelular y la membrana de las células endoteliales.

Activador de plasminógeno tipo tisular (tPA)

El tPA corresponde a una serino proteasa de aproximadamente 70 kDa, sintetizada vía constitutiva por la célula endotelial, que presenta una concentración plasmática de aproximadamente 2 µg/L y una vida media de 5 minutos. El gen que codifica para tPA está localizado en el cromosoma 8q11, contiene 14 exones con una extensión de aproximadamente 36,6 Kb.

Esta glicoproteína es sintetizada por la célula endotelial en forma monocatenaria con 562 aminoácidos que incluye un péptido señal de 22 aminoácidos y un propéptido de 10 aminoácidos. Posteriormente, la remoción de tres aminoáci-

dos resulta en una proteína madura de cadena simple de 527 aminoácidos, que contiene 5 dominios homólogos a otras proteínas: dominio *finger* o fibronectina tipo I, dominio similar a factor de crecimiento epidérmico, dos dominios tipo *kringle* homólogo a regiones de plasminógeno y finalmente un dominio serino proteasa.

Por acción de la plasmina, tPA es convertido en una estructura bicatenaria unida por puentes disulfuro mediante el clivaje en Arg275-Ile276, lo que incrementa la afinidad por fibrina potenciando su actividad. Presenta dos formas de glicosilación caracterizadas por la presencia o ausencia de carbohidratos en regiones específicas de la proteína y que contribuyen a modular su actividad funcional y regular la unión a receptores presentes en superficies celulares.

Activador de plasminógeno tipo uroquinasa (uPA)

El uPA corresponde a una serino proteasa de aproximadamente 54 kDa que alcanza una concentración plasmática de aproximadamente 4 µg/L, cumpliendo variadas funciones no solo en la fibrinólisis, sino también en regeneración de tejidos, angiogénesis, entre otros.

Esta proteína es expresada de manera inducible por diversos tipos celulares como células del epitelio renal, célula endotelial, macrófagos. Por su parte, el gen que la codifica está localizado en el cromosoma 10q26, contiene 11 exones y una extensión de aproximadamente 6,4 Kb. Se secreta como precursor inactivo monocatenario de 411 aminoácidos (sc-uPA) que contiene tres regiones estructurales: un dominio *kringle* homólogo a plasminógeno, dominio similar al factor de crecimiento epidérmico y dominio catalítico serino proteasa. El dominio *kringle* carece que sitio de unión de fibrina lo que explicaría la baja afinidad de uPA por fibrina. El sc-uPA se activa por acción de la plasmina o kalicreína a través de una proteólisis del enlace Lis158-Ile159, generando uPA de doble cadena unido por puentes disulfuro, denominado tc-uPA. Este presenta dos isoformas de alto (54 kDa) y bajo peso molecular (33 kDa), que si bien son capaces de activar plasminógeno, solo la forma de alto peso molecular tiene la capacidad de unirse al receptor uPA.

Primariamente, uPA activa a plasminógeno sobre superficies celulares mediante la escisión de un enlace Arg560Val con formación de Glu-plasmina. Si bien uPA tiene escasa afinidad por fibrina, el proceso de activación de plasminógeno se incrementa notablemente en presencia de fibrina

2.3 Plasmina y actividad fibrinolítica

La plasmina constituye la principal serino proteasa del sistema fibrinolítico, generada a partir de plasminógeno por acción de proteínas activadoras. La figura 14-1 presenta la activación de plasmina y su actividad fibrinolítica. En este sentido, la activación resulta eficiente cuando tanto plasminógeno (PLG) como tPA (expresado por la célula endotelial) se encuentran unidos a fibrina o receptores especí-

ficos expresados en la superficie celular, generando un ensamblaje trimolecular. Esta unión se ve favorecida por la presencia de sitios de unión a lisina presentes en dominios tipo *kringle* de ambas proteínas lo que potencia la generación de plasmina.

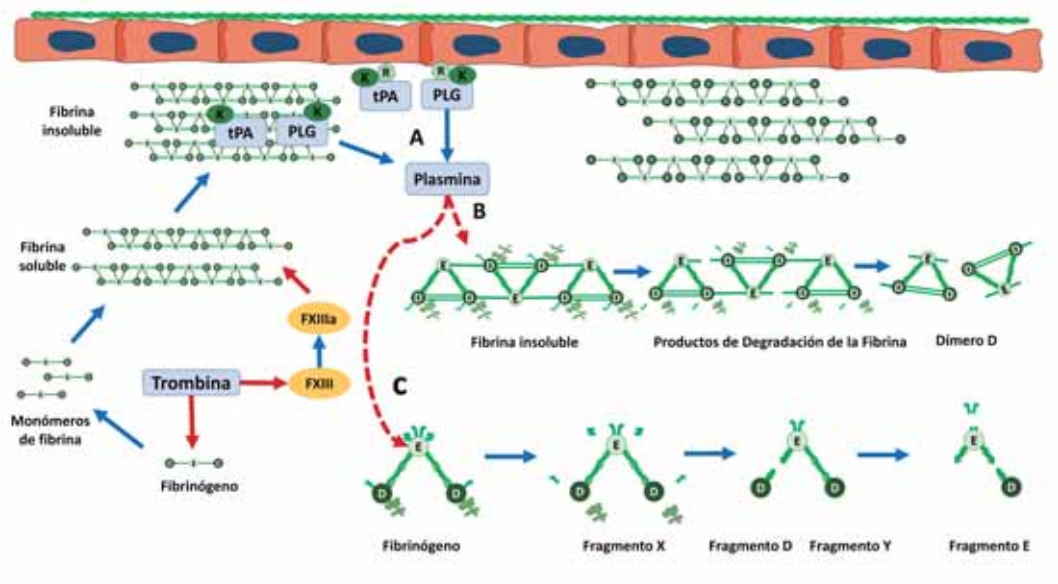


Figura 14-1. Mecanismos de activación de plasmina y actividad fibrinolítica. La generación de trombina constituye un evento clave en la hemostasia secundaria, que resulta en la generación de fibrina insoluble. (A) El Plasminógeno (PLG) es clivado por proteínas activadoras como el Activador del Plasminógeno tipo tisular (tPA). Esto ocurre cuando ambas proteínas colocalizan y se encuentran unidas a fibrina o receptores específicos (R) presentes en la superficie celular, unión que se ve favorecida por la presencia de sitios de unión a lisina en los dominios *kingle* (K). (B) Plasmina actúa sobre la fibrina solubilizándola mediante hidrólisis, generando productos de degradación de la fibrina y Dímero D. (C) En el caso del fibrinógeno, plasmina provoca un clivaje en cadenas alfa y beta dentro del dominio B generando fragmentos X. Clivajes posteriores generan otros fragmentos como Y, D y E.

El plasminógeno es convertido en plasmina por ruptura de una unión peptídica en la posición Arg560-Val561 en la región C-terminal, exponiendo una triada catalítica en el dominio serino proteasa. Este constituye un paso crítico pues resulta en una molécula de plasmina de doble cadena unida por puentes disulfuro, que presenta una cadena pesada de aproximadamente 60 kDa que contiene dominios *kringle* y una cadena liviana (aproximadamente 25 kDa) que contiene el sitio catalítico.

La plasmina provoca una proteólisis parcial en la región C-terminal del fibrinógeno circulante, donde más de treinta sitios de clivaje reconocidos por plasmina han sido identificados. Este clivaje ocurre en las cadenas alfa y beta dentro del dominio D del fibrinógeno resultando en una molécula denominada Fragmento X. Posteriormente, ocurren otros eventos de clivaje en tres cadenas polipeptí-

dicas, generando fragmentos Y, D y E, que sumados al fragmento X se conocen como productos de degradación del fibrinógeno (PDF), los cuales interfieren en la polimerización espontánea de la fibrina. En el caso de la fibrina (previamente estabilizada por acción del factor estabilizador de la fibrina), la plasmina produce la liberación de fragmentos conocidos como Dímeros D, biomarcador empleado en la clínica para evidenciar la activación de la fibrinólisis, siendo particularmente útil en coagulopatías de consumo como la coagulación intravascular diseminada (CID). Además, evidencia reciente demuestra que la elevación significativa de dímero D constituye un marcador pronóstico en pacientes con COVID-19, dado que su elevación se asocia a mayor grado de severidad del cuadro clínico.

3. REGULACIÓN DE LA FIBRINÓLISIS

El sistema fibrinolítico constituye un balance entre la activación del plasminógeno y la degradación de la fibrina, lo que se encuentra finamente regulado por una serie de mecanismos espacio-temporales. Los inhibidores de la fibrinólisis previenen el exceso de plasmina o actividad de activadores del plasminógeno, los que son neutralizados por proteínas denominadas serpinas (inhibidores de serino proteasas). Las serpinas forman complejos irreversibles con los sitios de serina de las proteínas blanco, generando clivajes proteolíticos y provocando una pérdida de actividad en estas últimas.

El sistema fibrinolítico es inhibido a nivel de la plasmina por acción de la α2-antiplasmina y a nivel de los activadores del plasminógeno por el PAI-1 y PAI-2. La figura 14-2 presenta los principales mecanismos de regulación de la fibrinólisis en humanos y sus componentes son detallados a continuación.

3.1 Alfa 2-antiplasmina (α2-AP)

Este inhibidor primario de la plasmina pertenece la familia de las serpinas y corresponde a una glicoproteína de cadena única de 70 kDa de síntesis hepática. Alcanza una concentración plasmática de aproximadamente 1 mM y presenta una vida media de 3 días. El gen que la codifica *(SERPINF2)* se encuentra ubicado en el cromosoma 18q21– 22, contiene 10 exones con una extensión de aproximadamente 16 Kb, que genera una proteína de 452 aminoácidos con dos puentes disulfuro, que se une a plasminógeno o queda en su forma libre que tiene menos actividad inhibidora. Esta glicoproteína circula en concentraciones significativamente superiores a otras serpinas reguladoras de la fibrinólisis alcanzando concentraciones plasmáticas de 70 mg/mL.

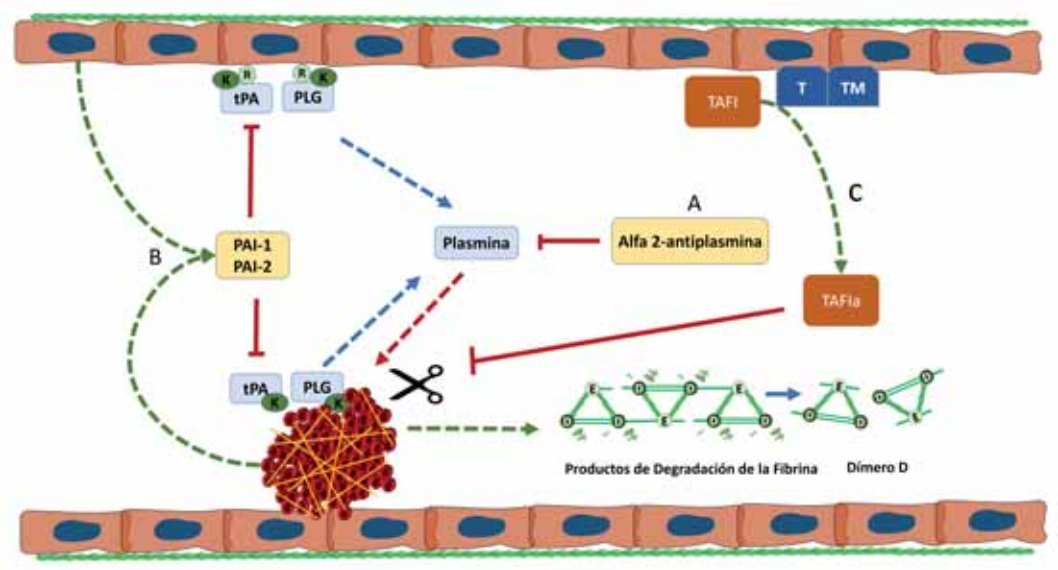


Figura 14-2. Principales mecanismos de regulación de la fibrinólisis en humanos. La regulación del sistema fibrinolítico se produce principalmente por acción de serpinas, ya sea sobre la plasmina o a nivel de activadores del plasminógeno. (A) La alfa 2-antiplasmina circulante interacciona con el sitio catalítico de plasmina formando un complejo con esta que se elimina a nivel hepático. (B) El inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1 y/o PAI-2) son secretados por células endoteliales (10%) o se encuentran en gránulos α plaquetarios. Adicionalmente, la activación plaquetaria genera síntesis *de novo* de PAI-1 a través de un mecanismo dependiente de trombina, inhibiendo tanto tPA como uPA. (C) TAFI es una proteína plasmática no serpina, que es activada por el complejo trombina-trombomodulina (T-TM) sobre el endotelio intacto. Al activarse (TAFIa), genera un clivaje de residuos de arginina y lisina de la región C-terminal de la fibrina, inhibiendo la fibrinólisis.

La alfa 2-antiplasmina produce inhibición mediante la inserción de un bucle de centro reactivo en el sitio catalítico de la plasmina, que escinde el enlace peptídico en la posición R364-M365 del bucle, formando un complejo α2-AP/plasmina que se elimina en el hígado.

3.2 Inhibidor del Activador del Plasminógeno (PAI-1 y PAI-2)

El inhibidor del activador del plasminógeno constituye un inhibidor fisiológico tanto de tPA como uPA, siendo PAI-1 el más importante de ambos. Este corresponde a una glicoproteína de 52 kDa y 379 aminoácidos, perteneciente al grupo de las serpinas, con las cuales tiene un 30-50% de homología. El gen que codifica para PAI-1 *(SERPINE1)* se encuentra en el cromosoma 7q21, contiene 9 exones con una extensión de aproximadamente 12 Kb, siendo sintetizado y secretado a la circulación por una amplia variedad de células como monocitos, macrófagos, células endoteliales, hepatocitos, adipocitos y plaquetas. Su expresión y liberación se encuentra regulada por diversos factores como citoquinas inflamatorias, factores de crecimiento, hormonas, glucosa y lipoproteínas.

En sangre, PAI-1 circula libre en plasma o almacenado en plaquetas. Su concentración plasmática es relativamente baja (5–50 ng/mL), donde su actividad es estabilizada por la formación de complejos con vitronectina. Evidencia científica da cuenta que el 90% del PAI-1 se encuentra en plaquetas, específicamente almacenado en gránulos α, presentando elevadas concentraciones (aproximadamente 300 ng/mL). Inicialmente, se pensaba que PAI-1 se sintetizaba en el megacariocito y se almacenaba en vesículas plaquetarias (gránulos α), observándose que solo una pequeña fracción de este se encontraba activo. Sin embargo, evidencia posterior demostró un interesante mecanismo de síntesis *de novo* de PAI-1 en plaquetas activadas, a partir de RNA mensajero traduccionalmente activo, a través de un mecanismo dependiente de trombina. Interesantemente, se observó que casi la totalidad del PAI-1 sintetizado *de novo* presentaba actividad, lo que demuestra que existe una mayor cantidad de PAI-1 activo en ambientes ricos en trombina, por lo que los autores sugieren que la contribución de plaquetas en la estabilización del coágulo podría relacionarse a su capacidad de síntesis de PAI-1 activo. Desde el punto de vista de su capacidad inhibitoria, PAI-1 reacciona con el tPA de cadena única y doble y con el uPA de cadena doble, pero la capacidad de inhibir el uPA de cadena única es muy limitada.

Por su parte, PAI-2 corresponde a una serpina de 393 aminoácidos, codificada por el gen *SERPINB2*, que contiene 8 exones con una extensión de 16,5 Kb ubicado en el cromosoma 18q21, siendo sintetizado por la placenta, macrófagos, keratinocitos y adipocitos. Los niveles circulantes de PAI-2 en sujetos sanos son prácticamente indetectables, sin embargo, durante el embarazo se observa un drástico incremento de su concentración hasta aproximadamente 250 ng/mL, disminuyendo rápidamente posterior al parto. Este fenómeno explica en parte las variaciones fisiológicas de la hemostasia en la mujer, que ocurren preferentemente en el tercer trimestre del embarazo, y que generan un estado "procoagulante" para hacer frente a la hemorragia durante el parto. Si bien PAI-2 tiene un espectro de acción similar al PAI-1, inhibe a los activadores del plasminógeno con menor eficiencia que el PAI-1, siendo más efectivo inhibiendo uPA que tPA.

3.3 Inhibidor de la Fibrinólisis activado por trombina (TAFI)

El inhibidor de la fibrinólisis activado por trombina (TAFI por su sigla en inglés *Trombin Activable Fibrinolysis Inhibitor*) es una proteína plasmática de 56 kDa que circula en concentraciones de 4-15 mg/mL, siendo un inhibidor de la fibrinólisis no-serpina. El gen que lo codifica *(CPB2)* se ubica en el cromosoma 13q14.11, contiene 11 exones y presenta una extensión de 48 Kb.

TAFI es sintetizado en el hígado y megacariocitos como un zimógeno inactivo (propéptido) de 423 aminoácidos, el que después de la remoción de un péptido señal genera una proenzima de 401 aminoácidos que es liberada a la circulación. Este zimógeno es activado a una enzima tipo carboxipeptidasa B mediante una ruptura del aminoácido arginina, reacción que es catalizada por el complejo trombina-trombomodulina (T-TM). Así, la trombina cliva al TAFI en el sitio de Arg92-Ala93 liberando un péptido de activación, mientras que la TM contribuye

a potenciar dicha activación con una eficiencia catalítica 1250 veces mayor que la trombina sola. La localización de la trombomodulina sobre la superficie de la célula endotelial sugiere que el complejo T-TM solo puede activar TAFI sobre endotelio intacto.

La fibrina presenta residuos de lisina expuestos que proveen sitios de unión con plasminógeno, que interactúa a través de sitios de unión a lisina presentes en algunos dominios kringle. Así, TAFI activado (TAFIa) ejerce su efecto antifibrinolítico por clivaje de residuos de arginina y lisina de la región C-terminal de la fibrina. Como consecuencia de esto, la retroalimentación positiva sobre la activación del plasminógeno es eliminada y el proceso fibrinolítico suprimido. Normalmente los residuos de lisina de la región carboxiterminal de la fibrina se unen con una elevada afinidad al plasminógeno y al activador tisular del plasminógeno (tPA) generando plasmina sobre el coágulo de fibrina. La activación del TAFI durante la formación del coágulo de fibrina resulta en la eliminación de los residuos de lisina y en consecuencia en una menor producción de plasmina.

4. ROL DE CÉLULAS Y SUS RECEPTORES EN LA FIBRINÓLISIS

Evidencia creciente releva el rol de células y sus receptores en la activación y regulación del sistema fibrinolítico, siendo importantes la célula endotelial, plaquetas y monocitos. Diversas moléculas de la superficie celular se unen al plasminógeno y/o sus activadores en células endoteliales, monocitos y muchos otros tipos celulares, potenciando su activación, mientras que otros se asocian a mecanismos de eliminación de plasminógeno y plasmina.

Dentro de los receptores de activación destacan especialmente *receptores para plasminógeno y receptor de urokinasa* (uPAR). El primer grupo corresponde a una amplia variedad de proteínas expresadas por diversas células que incluyen el complejo de glicoproteína IIb/IIIa plaquetario, Anexina 2, entre otros, que interactúan con los dominios tipo *kringle* de plasminógeno, específicamente a los residuos de lisina C-terminal. En el caso de Anexina 2, esta corresponde a una proteína de unión a fosfolípidos, abundantemente expresada en células endoteliales, monocito/macrófagos, células mieloides, entre otras. Sobre la superficie de células endoteliales forma complejos con otras proteínas, que permiten la unión de plasminógeno y tPA y sirviendo como un cofactor para la generación de plasmina, protegiéndola además de la acción de su inhibidor α2-AP. Por su parte, el receptor de uPA (uPAR) es expresado en monocitos, macrófagos, célula endotelial y fibroblastos, encontrándose anclado a la membrana y al unirse a uPA permite mantener la actividad de esta proteína activadora del plasminógeno.

Dentro de los receptores asociados a eliminación de plasminógeno o plasmina destaca la proteína relacionada al receptor de LDL (LRP por su nombre en inglés *LDL receptor-related protein*), que se encontraría involucrado con el aclaramiento hepático tanto de uPA y tPA.

Particularmente relevante es el complejo trombina-trombomodulina, dado que este complejo presenta variadas funciones reguladoras de la hemostasia, dado que por una parte actúa en la activación de proteína C y la subsecuente formación del sistema de la proteína C activada, sino además en el mecanismo de activación de TAFI, ejerciendo por tanto un rol antifibrinolítico al limitar la degradación de fibrina.

Finalmente, las plaquetas cumplen un rol antifibrinolítico importante dado que secretan diversos inhibidores como α2-AP, PAI-1 y TAFI, los que se encuentran almacenados en gránulos alfa. En el caso de PAI-1 se ha demostrado síntesis *de novo* de esta proteína en plaquetas activadas por trombina lo que soporta la idea del rol de plaquetas en la estabilización del coágulo. Por su parte, TAFI puede potencialmente ser activado en la superficie plaquetaria, basado en la evidencia que demuestra la presencia de TM funcional en plaquetas activadas.

5. ALTERACIONES DEL SISTEMA FIBRINOLÍTICO

Al igual que ocurre en la coagulación, el sistema fibrinolítico se encuentra finamente regulado y requiere de un permanente equilibrio entre la formación de plasmina y su regulación. Por tanto, alteraciones de este balance pueden desencadenar fenómenos de la hemostasia, tanto hemorrágicos como trombóticos. A diferencia de las pruebas de laboratorio que evaluan la coagulación, el estudio de la fibrinólisis es menos frecuente en la rutina del laboratorio. Sin embargo, ensayos que evalúen el sistema fibrinolítico contribuyen al adecuado diagnóstico de patologías hereditarias o adquiridas, así como también son necesarios para evaluar la terapia antifibrinolítica.

5.1 Variaciones fisiológicas de proteínas de la fibrinólisis

Desde el punto de vista de la adecuada interpretación de los resultados de pruebas de estudio de la fibrinólisis, es necesario considerar las variaciones fisiológicas que pueden ocurrir de algunos parámetros, siendo particularmente importante la población pediátrica y embarazadas. En el caso de población neonatal y pediátrica, diversos estudios muestran cambios en parámetros de la hemostasia sanguínea en esta población. Esto surge del concepto de "hemostasia del desarrollo" acuñado por Andrew en 1987 y que dice relación con los cambios en la hemostasia relacionados con la edad, estableciendo que el balance hemostático en etapa neonatal y pediátrica es distinto al observado en adultos. Si bien este fenómeno fisiológico estaría relacionado con la madurez de órganos que sintetizan proteínas de la hemostasia, evidencia reciente demuestra un mecanismo molecular que explicaría igualmente estos cambios y que se encontraría relacionado con microRNAs (miRNAs). Así, evidencia reciente demuestra que proteínas como fibrinógeno y PAI-1 se encuentran regulados por miRNAs, demostrándose que PAI-1 se encuentra regulado por miR-421 and miR-30c en células endoteliales.

Diversos estudios demuestran que los niveles plasmáticos de proteínas de la hemostasia son significativamente menores a los observados en adultos, existiendo además diferencias entre recién nacidos de término v/s recién nacidos de pretérmino quienes presentan aún menores niveles. Adicionalmente, se ha observado diferencias en los valores observados dependiendo de los reactivos utilizados en el laboratorio, siendo con otras condiciones preanalíticas aspectos críticos a estandarizar en el laboratorio de hemostasia. Con todo, estos hallazgos tienen importantes implicancias para el adecuado diagnóstico, prevención y tratamiento de enfermedades de la hemostasia en niños. Particular relevancia tiene el laboratorio para informar adecuadamente los resultados de hemostasia en población pediátrica, existiendo lineamientos emanados del Subcomité de Estandarización de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia, que recomienda para los laboratorios clínicos el establecimiento de intervalos de referencia dependientes de edad utilizando sus propias condiciones técnicas de trabajo.

Desde el punto de vista de la fibrinólisis, la evidencia disponible demuestra que el potencial de generación de plasmina en recien nacidos es significativamente menor que el observado en adultos. Lo anterior podría ser explicado en parte por la característica del plasminógeno, que si bien presenta una estructura aminoacídica similar al de adultos, presenta un mayor grado de glicosilación, menor capacidad de activación por tPA y se une débilmente a la superficie de la célula endotelial. Además, las concentraciones plasmáticas de PLG y α2-AP en neonatos son aproximadamente 50% de las de adultos. En contraste, niveles de dímero D son mayores en recién nacidos, siendo mayores en el primer año de vida. La tabla 2 presenta los principales parámetros de laboratorio para estudio de la fibrinólisis en población pediátrica v/s adulta.

Tabla 14-2. Parámetros de laboratorio para estudio de la fibrinólisis en población pediátrica v/s adulta

PARÁMETRO	VALOR NEONATAL	NORMALIZACION
Plasminógeno (PLG)	Disminuido	6 meses
Alfa2-Antiplasmina (α2-AP)	Normal a disminuido	6 meses
Activador del Plasminógeno tisular (tPA)	Incrementado	1 semana
Dímero D	Incrementado	16 años

Otra población especial relevante desde el punto de vista de la hemostasia corresponde a las embarazadas. De modo general, el embarazo constituye un estado protrombótico e hipofibrinolítico, resultado de cambios fisiológicos ocurridos preferentemente en el tercer trimestre de gestación. Así junto con cambios asociados a cambios protrombóticos, desde el punto de vista de la

fibrinólisis destaca la elevación de fibrinógeno y plasminógeno en aproximadamente un 50% en el tercer trimestre, acompañado con incremento de PAI-1 y especialmente de PAI-2 por su expresión por placenta, llegando a observarse incremento de 25 veces su valor basal. Adicionalmente, los niveles de dímero D incrementan en la medida que avanza el embarazo.

5.2 Alteraciones de la fibrinólisis

Desde el punto de vista de las alteraciones de la fibrinólisis, estas se asocian tanto a un incremento de la actividad fibrinolítica lo que se conoce como hiperfibrinólisis y que se encuentran relacionadas con fenómenos de tipo hemorrágico, como también a una actividad fibrinolítica insuficiente (hipofibrinólisis) que genera una predisposición a hipercoagulabilidad. En ambos casos, estas alteraciones pueden ser hereditarias o adquiridas.

Dentro de los desórdenes hemorrágicos de la fibrinólisis de tipo hereditario destacan la deficiencia de α2-AP, déficit de PAI-1. La *deficiencia de α2-AP* corresponde a una rara condición autosómica recesiva, caracterizada por una amplia gama de manifestaciones hemorrágicas como prolongado sangramiento de heridas, epistaxis, gingivorragia, hematuria, hemartrosis. Los sujetos homocigotos presentan una significativa tendencia al sangrado, mientras que los heterocigotos presentan eventos hemorrágicos posterior a procedimientos quirúrgicos, extracciones dentales y trauma. Diversas variaciones de secuencia en el gen codificante de α2-AP han sido descritas asociadas a este cuadro, existiendo defectos cuantitativos (tipo I) y cualitativos (tipo II). En el primer grupo, los pacientes presentan disminución de antígeno y de actividad plasmática, mientras que en la enfermedad de tipo II, esta se caracteriza por baja actividad funcional con niveles normales de antígeno. De modo general, los ensayos de *screening* globales de coagulación son normales tanto en la patología cuantitativa como cualitativa. En el caso de la deficiencia de PAI-1, esta patología presenta un modelo de herencia de tipo autosómico recesivo, pudiendo ser de tipo cuantitativa (disminución o ausencia de la proteína) o cualitativa, caracterizada por la síntesis de PAI-1 disfuncional, con niveles detectables de proteína, pero actividad funcional reducida o ausente. En ambos casos se producen sangrados prolongados en presencia de pruebas de coagulación normales, por lo que el diagnóstico se sustenta en ensayos de PAI-1 antigénicos (ELISA) y funcionales (cromogénicos).

Por su parte, dentro de las alteraciones adquiridas que se relacionan con hiperfibrinólisis se encuentra el schok, trauma mayor y cirugías extensas. Igualmente puede observarse en cirrosis hepática, falla renal, complicaciones obstétricas y cáncer, particularmente en pacientes con leucemia. El estado hiperfibrinolítico es un hallazgo común en pacientes con cirrosis y en estados avanzados se encuentra asociado a sangramiento gastrointestinal y mucocutáneo. Este fenómeno ocurre dado que el sistema fibrinolítico está activado por un incremento de la liberación de tPA y disminución de su aclaramiento hepático, además de la disminución de TAFI, PAI-1 y α2-AP. En el caso de leucemias, un claro ejemplo de esto corresponde a la Leucemia Aguda Promielocítica, caracterizada por la

presencia de la t(15:17) que genera un oncogen de fusión PML-RARα, que frena la diferenciación de precursores mieloides. Así, la hemorragia observada en pacientes es el resultado de la disminución de factores de coagulación e incremento de la fibrinólisis (elevación de concentraciones circulantes de uPA y tPA, disminución de PAI-1, TAFI y α2-AP).

Particularmente relevante como ejemplo de este fenotipo de hiperfibrinólisis es la Coagulación Intravascular Diseminada (CID), caracterizada por consumo de factores acompañado de hiperfibrinólisis. De este modo, desde el punto de vista del laboratorio, este cuadro se caracteriza por la presencia de trombocitopenia, prolongación de pruebas globales de hemostasia (Tiempo de Protrombina y Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada) e hipofibrinogenemia. Adicionalmente, la presencia de Productos de Degradación de la Fibrina (PDF) y especialmente la presencia de Dímero D permiten demostrar la presencia de hiperfibrinólisis.

En contraste, estados hipofibrinolíticos contribuyen a la trombosis, tanto venosa como arterial, pudiendo tener origen congénito a ambiental. Patologías como Lupus Eritematoso Sistémico (LES), Síndrome Antifosfolípidos (SAF), hipertensión pulmonar y enfermedad renal crónica pueden presentar este cuadro, así como también puede ser consecuencia de enfermedades crónicas no transmisibles como diabetes, hipertensión y obesidad.

5.3 Alteraciones de la fibrinólisis en COVID-19

En el contexto actual de la pandemia por COVID-19 es frecuente observar alteraciones de la hemostasia en estos pacientes. Anormalidades de la coagulación, especialmente complicaciones trombóticas arteriales y venosas han sido descritas en pacientes con COVID-19, con una incidencia sobre el 30% en pacientes que ingresan a unidades de paciente crítico. Sin embargo, igualmente se ha observado complicaciones hemorrágicas en estos pacientes. En cuanto a marcadores de laboratorio, se ha descrito valores significativamente elevados de dímero D en pacientes con cuadros severos, en contraste a lo observado en pacientes que presentan cuadros leves de la enfermedad. Interesantemente, se ha descrito una marcada elevación de tPA y PAI-1 en pacientes hospitalizados por COVID-19, encontrándose asociados a complicaciones respiratorias. Además, la presencia de valores extremadamente elevados de tPA se correlacionó con mortalidad, lo que sugiere una estimulación espontánea de la fibrinólisis expresándose un balance a favor de esta (hiperfibrinólisis).

6. LECTURAS SUGERIDAS

Medcalf RL, Keragala CB. The Fibrinolytic System: Mysteries and Opportunities. Hemasphere. 2021. 5(6):e570.

Rijken DC, Lijnen HR. New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. J Thromb Haemost. 2009. 7(1):4-13.

Law RH, Caradoc-Davies T, Cowieson N, Horvath AJ, Quek AJ, Encarnacao JA, Steer D, Cowan A, Zhang Q, Lu BG, Pike RN, Smith AI, Coughlin PB, Whisstock JC. The X-ray crystal structure of full-length human plasminogen. Cell Rep. 2012. 1(3):185-90.

Cesarman-Maus G, Hajjar KA. Molecular mechanisms of fibrinolysis. Br J Haematol. 2005. 129(3):307-21.

Urano T, Castellino FJ, Suzuki Y. Regulation of plasminogen activation on cell surfaces and fibrin. J Thromb Haemost. 2018. 16(8):1487-1497.

Sillen M, Declerck PJ. Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor (TAFI): An Updated Narrative Review. Int J Mol Sci. 2021. 22(7):3670.

May JE, Wolberg AS, Lim MY. Disorders of Fibrinogen and Fibrinolysis. Hematol Oncol Clin North Am. 2021.S0889-8588(21)00090-3.

Franchini M, Zaffanello M, Mannucci PM. Bleeding Disorders in Primary Fibrinolysis. Int J Mol Sci. 2021. 22(13):7027.

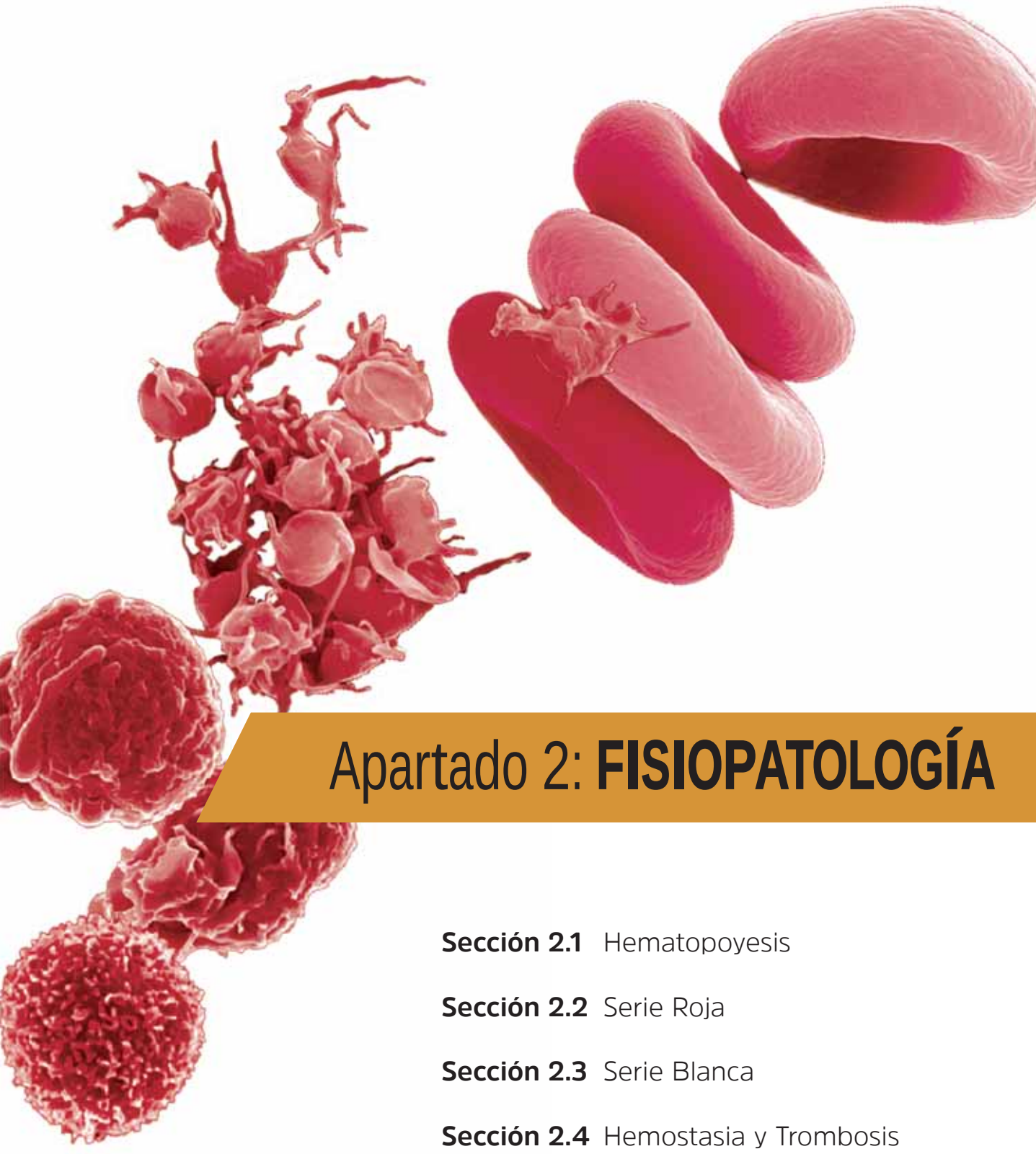
Miles LA, Ny L, Wilczynska M, Shen Y, Ny T, Parmer RJ. Plasminogen Receptors and Fibrinolysis. Int J Mol Sci. 2021. 22(4):1712.

Toulon P. Developmental hemostasis: laboratory and clinical implications. Int J Lab Hematol. 2016. 38 Suppl 1:66-77.

Devreese KMJ. COVID-19-related laboratory coagulation findings. Int J Lab Hematol. 2021. 43 Suppl 1:36-42.

Tang N, Li D, Wang X, Sun Z. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. J Thromb Haemost. 2020. 18(4):844-847.

Iba T, Levy JH, Levi M, Thachil J. Coagulopathy in COVID-19. J Thromb Haemost. 2020. 18(9):2103-2109.



Apartado 2: **FISIOPATOLOGÍA**

Sección 2.1 Hematopoyesis

Sección 2.2 Serie Roja

Sección 2.3 Serie Blanca

Sección 2.4 Hemostasia y Trombosis

SECCIÓN 2.1 **HEMATOPOYESIS**

Capítulo 15. Aplasia medular

Capítulo 16. Leucemias agudas

Capítulo 17. Síndromes Mielodisplásicos

Capítulo

15

APLASIA MEDULAR

Marcela Córdova y Pablo Sepúlveda

Resumen

1. Introducción

2. Aplasia medular adquirida
- 2.1. Epidemiología
- 2.2. Cuadro clínico
- 2.3. Estudios de laboratorio
  - 2.3.1. Sangre periférica
  - 2.3.2. Otros estudios de laboratorio
  - 2.3.3. Médula ósea
- 2.4. Etiología
- 2.5. Fisiopatología
- 2.6. Tratamiento y evolución de la aplasia medular
  - 2.6.1. Tratamiento de soporte
  - 2.6.2. Tratamiento y respuesta
- 2.7. Tratamiento de soporte
- 2.8. Tratamiento y respuesta

2.8.1. Trasplante de médula ósea
2.8.2. Tratamiento inmunosupresor
2.9. Hemoglobinuria paroxística nocturna

3. Aplasias medulares hereditarias y/o congénitas
3.1. Anemia de Fanconi
3.2. Disqueratosis congénita
3.3. Síndrome de Shwachman-Diamond
3.4. Hipoplasia cartílago-pelo
3.5. Síndrome de Pearson
3.6. Disgenesia reticular
3.7. Trombocitopenia amegacariocítica
3.8. Anemia Blackfan-Diamond
3.9. Neutropenia congénita severa (síndrome Kostmann)
3.10. Trombocitopenia con ausencia de radio

4. Lecturas sugeridas

RESUMEN

La aplasia medular es un patología poco frecuente, asociada a una alta morbimortalidad. Se clasifican según su causa en genética o adquirida. Actualmente, y con el desarrollo de técnicas moleculares, se puede decir que aproximadamente el 85-90% de las insuficiencias medulares son adquiridas y el 10-15% restante presentan una causa genética conocida, siendo estas más frecuentes en la edad pediátrica. En el presente capítulo se revisan las diferentes formas de aplasia medular, tanto congénitas como adquiridas, las diferentes hipótesis actuales acerca de su fisiopatología y se muestran las diferentes formas de tratamiento y sus resultados.

1. INTRODUCCIÓN

La falla medular está caracterizada, desde el punto de vista clínico y de laboratorio, por una disminución variable en los recuentos periféricos de los elementos sanguíneos (glóbulos rojos, leucocitos y plaquetas); estas citopenias tienen su origen en una marcada reducción en la producción efectiva de ellos por la médula ósea. Esta alteración puede ser de una serie específica (monocitopenia) o de todas ellas (pancitopenia). La disminución de la entrega de células maduras desde la médula ósea a la circulación puede estar dada por alteraciones en el número de progenitores hematopoyéticos, como en la aplasia medular adquirida, donde se observa una médula con celularidad disminuida en forma global o para una línea específica como en la anemia de Blackfan Diamond, en donde encontramos una médula con celularidad aumentada, pero con detención maduracional, llamada hematopoyesis ineficaz.

El primer caso de AM adquirida fue descrito en el año 1888 por Paul Ehrlich en una autopsia de una paciente embarazada quien presentaba anemia severa, hemorragias cutáneas y fiebre. En la autopsia se encontró que la médula ósea se encontraba reemplazada por grasa. Posteriormente, durante el siglo XX se describieron muchos y diferentes cuadros asociados a diferentes grados de aplasia o hipoplasia medular, de diferentes etiologías y cursos clínicos. Se ha avanzado en forma importante en la comprensión de su fisiopatología y su tratamiento, logrando en la actualidad, pese a la severidad de la mayoría de las formas de aplasia, alcanzar tasas de curación importantes y definitivas.

La AM es una enfermedad originada por la lesión de las células hematopoyéticas pluripotenciales, lo que conduce a la desaparición progresiva de los precursores en la médula ósea. Clínicamente se presenta de manera subaguda, generalmente acompañada de pancitopenia en sangre periférica, de mayor o menor severidad asociada a una marcada disminución en el número de progenitores en la médula ósea. Para su diagnóstico es obligatoria la realización de una biopsia de médula ósea en la que se confirmará la disminución de los precursores en ausencia de otra hemopatía asociada. Sus causas pueden ser adquiridas, o hereditarias (no necesariamente expresadas al nacimiento) o congénitas (ex-

presadas desde el nacimiento). Las causas de la aplasia medular son múltiples y su curso clínico también es variable. En la tabla 5-1 se describe una clasificación de la AM considerando el momento de aparición de la misma.

Tabla 15-1. Clasificación de la aplasia medular

- **Hereditarias**
  - Anemia de Fanconi
  - Disqueratosis congénita
  - Síndrome Schwachman-Diamond
  - Disgenesia reticular
  - Trombocitopenia amegacariocítica
  - Anemia aplásica familiar
  - Síndromes mielodisplásicos
  - Síndromes no hematológicos (S. Down, S. Shekel, S. Dubowitz)
- **Adquiridas**
  - Secundarias
    - Radiación
    - Drogas
    - Virus
    - Enfermedades inmunológicas
      - Fascitis eosinofílica
      - Hipogamaglobulinemia
    - Timoma
    - Embarazo
    - Hemoglobinuria paroxística nocturna
    - Preleucémica
  - Idiopática

Desde un punto de vista de la severidad se clasifica en aplasia medular severa cuando se cumplen en sangre periférica al menos dos de los siguientes requisitos: neutrófilos menor a 500/µL, recuento de plaquetas menor a 20.000/µL e índice reticulocitario menor a 1%.

Además, la biopsia de médula ósea debe tener menos de un 25% de la celularidad normal. Si no se cumplen estos criterios el cuadro se clasifica como aplasia medular leve o moderada, lo que determinará la conducta terapéutica y pronóstico (tabla 5-2).

Tabla 15-2. Definición de severidad en aplasia medular

Aplasia medular severa (Camita *et al*, 1976)	• Médula ósea Celularidad menor al 25% ó 25 – 50% con menos de 30% cel. Hematopoyéticas
	• Sangre periférica (dos de los 3 criterios) Neutrófilos menores de 500 Plaquetas menores 20.000 Reticulocitos menores a 1%
Aplasia medular muy severa (Bacigalupo *et al*, 1988)	• Neutrófilos menores de 200
Hipoplasia o aplasia leve	• Paciente con pancitopenia que no cumple requisitos anteriores

2. APLASIA MEDULAR ADQUIRIDA

Esta es la forma más frecuente de aplasia, y en esta denominación se incluyen los pacientes con pancitopenia asociada a hipoplasia o aplasia medular, en los que no existe evidencia de enfermedad hereditaria y se descartan otras causas secundarias de pancitopenia. En aproximadamente el 75% de estos pacientes no es posible determinar una etiología, si bien cada vez es más evidente que el mecanismo subyacente es consecuencia de un fenómeno autoinmune favorecido por diferentes HLA. De entre las causas identificables, las más frecuentes son la exposición a fármacos y agentes químicos, una hepatitis viral y otros agentes infecciosos y las enfermedades de naturaleza inmune.

2.1. Epidemiología

La incidencia anual de aplasia medular presenta una distribución geográfica característica, con un patrón opuesto a la distribución de leucemia, ya que tiene una mayor incidencia en los países del tercer mundo y menor en Europa y Estados Unidos. Grandes estudios prospectivos muestran que en los países desarrollados, la AM tiene una incidencia de 2 casos por millón de habitantes, sin embargo esta alcanza hasta 6 casos por millón en algunas regiones rurales de Tailandia; en Latinoamérica existen escasos estudios epidemiológicos, en Ciudad de México se ha reportado una incidencia de 3,9 casos por millón de habitantes con una significativa mayor incidencia en la población pediátrica (4,2 casos/10^6/año).

El rango etario de presentación más frecuente va desde los 10 a 25 años y después de los 60 años, afectando por igual a ambos sexos. La distribución de la

mortalidad, muestra que esta es uniforme hasta los 55 años, incrementándose sustancialmente desde esa edad.

Los factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad parecen ser algo diferentes entre los países desarrollados y en vías de desarrollo, así por ejemplo, si bien la forma predominante en todo el mundo es la aplasia medular adquirida idiopática, porque no se logra establecer un agente causal, en Europa se reporta como uno de los factores de riesgo principales los fármacos, en Asia la mayor incidencia está relacionada a estatus socioeconómico bajo, exposición a solventes y cultivo de arroz.

2.2. Cuadro clínico

Para realizar el diagnóstico de un paciente con aplasia medular, es necesario una cuidadosa evaluación clínica y el estudio de pruebas complementarias a nivel de sangre periférica y medular.

Se presentan frecuentemente con síntomas de anemia, asociados a hemorragias de piel y mucosas y en los adultos con alteraciones visuales secundarias a hemorragias intrarretinales. La neutropenia se manifiesta con la presencia de úlceras bucales, infecciones bacterianas y fiebre. Los síntomas de anemia se caracterizan por palidez, decaimiento y taquicardia, en general bien tolerada, ya que su velocidad de instalación es lenta, a no ser que se agregue una hemorragia importante asociada a la trombocitopenia.

La aparición de esta sintomatología depende de la velocidad de instalación de la enfermedad y también de la vida media de los elementos sanguíneos, esto explica que, en general, los pacientes presenten manifestaciones hemorrágicas e infecciosas antes o de mayor cuantía que las manifestaciones anémicas (Vida media de plaquetas 8-10 días, neutrófilos 7-9 horas y eritrocitos 120 días).

2.3. Estudios de laboratorio

La alteración hematológica característica de la aplasia medular es la pancitopenia que en algunas ocasiones ha ido precedida de una o dos citopenias. Es importante preguntar por resultados de laboratorio previos. Si están disponibles y muestran hallazgos de citopenias previas o progresivas en las últimas 6 semanas refuerzan la sospecha de aplasia.

Para el estudio completo se recomienda la realización de las pruebas indicadas en la tabla 15-3.

Tabla 15-3. Exámenes de laboratorio e imágenes necesarias para el diagnóstico de Aplasia Medular.

Laboratorio de Hematología
• Hemograma, recuento de reticulocitos, frotis sanguíneo, hemoglobina fetal • Coagulación: estudio completo de coagulación (Actividad de Protrombina, Tiempo de Tromboplastina Parcial, Fibrinógeno, Dímero D) • Perfil de hierro (ferritina, ferremia, transferrina, índice de saturación de transferrina) • Citometría de flujo: estudio de CD55 y CD59 de membrana. En pacientes con defectos de GATA2 podemos encontrar monocitopenia, deficiencias de linfocitos B, NK y células dendríticas
Bioquímica clínica
• Electrolitos plasmáticos, glucosa, LDH, ácido úrico y función renal y hepática • Determinación de vitamina B12, ácido fólico • Las pruebas de función pancreática exocrina (tripsinógeno pancreático, isoamilasa sérica) pueden estar alteradas en pacientes pediátricos con síndrome de Shwachman-Diamond
Laboratorio de microbiología
• Determinación de virus de hepatitis A, B y C • Determinación de virus herpes: virus de Epstein-Barr, CMV • Determinación de VIH • Determinación de Parvovirus B19
Laboratorio de Inmunología
• Inmunoglobulinas, subpoblaciones linfocitarias • Pruebas de autoinmunidad no órgano-específicas: se recomienda descartar las causas más frecuentes de conectivopatía (factor reumatoide y ANA), y según los datos de la historia clínica ampliar el estudio si se considera adecuado.
Pruebas de imagen
• Radiografía de tórax, Radiografía de huesos largos y cráneo, ecografía abdominal y otras según clínica.
Tipificación de antígenos leucocitarios humanos (HLA)
• Estudio HLA del paciente y sus familiares de primer grado, debe realizarse lo antes posible tras el diagnóstico de la aplasia con la finalidad de, si es necesario, ofrecer el trasplante lo más precoz posible.
Estudio de la médula ósea
• Mielograma, biopsia médula ósea y cariograma de médula ósea.
Estudio genético
• Actualmente, los estudios moleculares mediante técnicas de secuenciación masiva permiten realizar el diagnóstico específico de un número significativo de síndromes que se asocian a insuficiencias medulares con costos cada vez mas accesibles.
Estudio de fragilidad cromosómica
• El estudio de fragilidad cromosómica se debe realizar en el screening diagnóstico de aplasia medular en todo paciente de menos de 50 años. También se recomienda su realización antes de proceder a un trasplante alogénico en su donante familiar.

2.3.1. Sangre periférica

En la AM, los recuentos celulares están uniformemente disminuidos, comprometiéndose, en general, de manera más severa la serie blanca y las plaquetas (50% de los pacientes presentan menos de 20.000/µL al diagnóstico). El frotis muestra habitualmente anemia normocítica o macrocítica y normocrómica. El RDW (plano de distribución del glóbulo rojo), que es un índice de anisocitosis, se encuentra normal y el recuento reticulocitario está disminuido. El tamaño de las plaquetas es normal, sin presencia de macroplaquetas u otros rasgos displásicos. El número de granulocitos está disminuido, pero su función fagocítica y bactericida es normal.

2.3.2. Otros estudios de laboratorio

El estudio de la hemoglobina (Hb) puede exhibir un incremento de la hemoglobina fetal que muestra el estrés medular compensatorio. Existe un incremento en la expresión del antígeno I en los eritrocitos, lo que aumenta su riesgo de lisis por anticuerpos fríos.

Los niveles de folato y vitamina B_{12} son normales y la eritropoyetina se encuentra elevada en un mayor rango que el esperable para el grado de anemia. El hierro sérico se encuentra normal o aumentado y la capacidad de fijación de la transferrina (TIBC) se halla saturada, y la ferritina sérica se encuentra elevada.

Las pruebas de función hepática se encuentran alteradas en los pacientes en que la aplasia se asocia a hepatitis. Los niveles de inmunoglobulinas están ocasionalmente disminuidos.

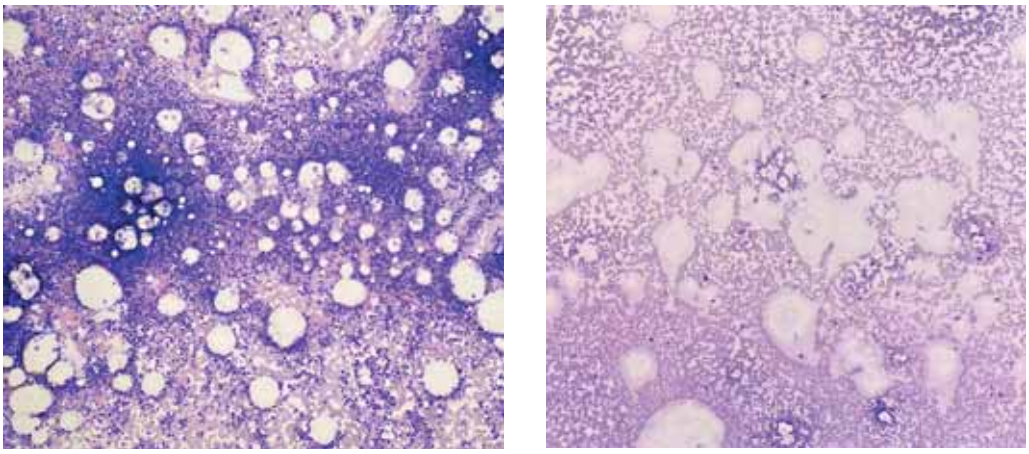
Los estudios cromosómicos son habitualmente normales, sin embargo en el último tiempo se han descrito alteraciones genéticas inespecíficas, que no se han asociado a pronóstico ni a respuesta a tratamiento.

2.3.3. Médula ósea

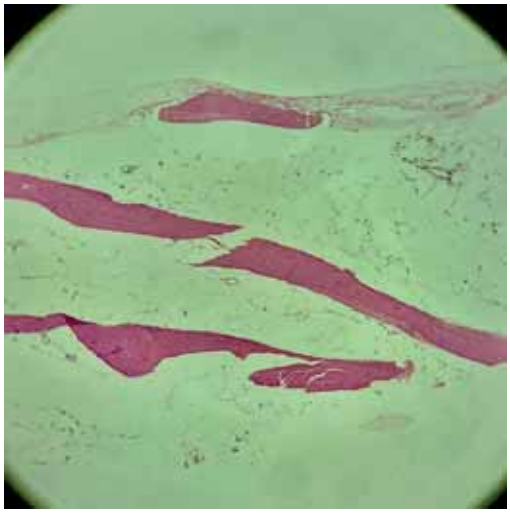
Para establecer el diagnóstico de AM además del mielograma, es imprescindible obtener una biopsia de médula ósea para evaluar la celularidad desde un punto de vista cuantitativo y cualitativo (figura 15-1) y existencia de fibrosis o infiltrados anormales.

Para poder realizar un buen estudio histológico, el cilindro de biopsia de médula debe tener al menos 2 cm de longitud. Asimismo, se debe evitar la biopsia tangencial ya que, aun en condiciones normales, la médula subcortical es más hipocelular que la profunda.

Fundamental es la biopsia medular, la que muestra, habitualmente, hipocelularidad con espículas vacías y reemplazo por grasa. La celularidad observada es en base, predominantemente de linfocitos y células plasmáticas



A **B**



C

Figura 15-1. Microfotografías de Mielograma. A. Mielograma de paciente con Celularidad Normal. B Mielograma de paciente con aplasia medular (Se observa celularidad disminuida en los grumos de médula ósea). C. Biopsia de médula ósea de paciente con aplasia medular

2.4. Etiología

En la gran mayoría de los casos de AM adquirida es difícil establecer un factor causal y por esta razón son catalogadas de "idiopáticas", existen otros casos en que se puede identificar claramente una causa, y en otros en que podría existir un factor del huésped asociado a una mayor incidencia de la enfermedad, tal es el caso de la alta asociación del antígeno de histocompatibilidad HLA-DR2, que se describe con una frecuencia de dos veces sobre la población normal en pacientes portadores de la enfermedad; su relación etiopatogénica aún no está definida.

Muchos de los pacientes recién diagnosticados han estado expuestos en forma previa a la aparición de los síntomas a fármacos o sustancias potencialmente mielotóxicas las que también se encuentran al interrogar a población sana, sin la enfermedad, por esta razón es difícil encontrar una clara relación causa efecto entre un medicamento y un paciente determinado. Además es necesario considerar que la evolución clínica, manejo y respuesta al tratamiento están relacionados más a la severidad de la enfermedad que al agente causal, de esta forma la aplasia secundaria a fármacos o tóxicos tiene un pronóstico similar a las formas idiopáticas. La otra relación causal es con enfermedades infecciosas virales; está clara y bien definida la aplasia post-hepatitis y su relación causal.

En la tabla 15-4 se detallan los medicamentos y agentes infecciosos asociados a la Aplasia medular.

Tabla 15-4. Clasificación de fármacos y agentes infecciosos asociados a aplasia medular

Fármacos
Drogas que habitualmente producen aplasia
Agentes quimioterápicos
Benceno
Reacciones idiosincráticas
Cloranfenicol
Antiinflamatorios no esteroidales
Sulfas
Antiepilépticos y sicotrópicos
Drogas antitiroídeas
Sales de oro, alopurinol, penicilamina.
Virus
Virus Ebstein Barr
Virus Hepatitis A, No A, No B, No C, No G
VIH

2.5. Fisiopatología

Desde el punto de vista teórico, la aplasia medular se debe a una alteración numérica o funcional de las células troncales hematopoyéticas, a alteraciones en el estroma de la médula ósea o a una combinación de ambas.

Las células troncales hematopoyéticas (*"Stem cells", SC*) se caracterizan por su alta capacidad proliferativa, el potencial para diferenciarse a las diferentes líneas celulares, su propiedad de renovarse a sí mismas (capacidad de generar otras SC por mitosis sin diferenciación) y desde el punto de vista inmunológico marcan para un tipo de antígeno específico, CD34+. Estas células se definen además

por su capacidad de repoblar el compartimiento hematopoyético de animales letalmente irradiados. Al estudiar esta población celular en los pacientes con AM, a través de citometría de flujo, se ha descrito una marcada disminución en el número de ellas.

Funcionalmente, las células hematopoyéticas diferenciadas, que normalmente son capaces de formar colonias eritroides, mieloides y megacariocíticas están también muy reducidas y los análisis *in vitro* de células hematopoyéticas muy primitivas muestran una marcada disminución.

Los pacientes con aplasia medular presentan pancitopenia cuando los progenitores hematopoyéticos han caído a menos del 1% de los valores normales. Esto indica que las células hematopoyéticas presentan una gran capacidad de compensación.

En condiciones normales, la proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas depende de factores de crecimiento específicos y de la indemnidad del estroma medular y este podría ser un factor que produce la aplasia medular, sin embargo, se ha demostrado una función celular normal en las células estromales, y niveles circulantes y producción *in vitro* de citoquinas en rangos normales o incluso elevados. Esta evidencia es comprobada desde el punto de vista clínico, si consideramos que al someter a los pacientes a trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH), las células estromales continúan siendo de origen del huésped y permiten el sostén y posterior repoblamiento de la médula con SC provenientes de un donante sano. Además, la estimulación con factores de crecimiento es habitualmente ineficaz para mantener una adecuada hematopoyesis. Así se puede entender que la aplasia medular se produce fundamentalmente por un daño directo sobre la células troncales; este puede producirse en forma directa o a través de un mecanismo inmunológicamente mediado:

Daño directo

La forma más común de aplasia transitoria o definitiva es iatrogénica al uso de drogas citotóxicas o radioterapia como tratamiento antineoplásico, en estos casos los agentes actúan directamente o a través de intermediarios dañando el DNA celular impidiendo la proliferación y/o desencadenando mecanismos apoptóticos (muerte celular programada); los derivados del benceno utilizan el mismo mecanismo. Este mecanismo de daño también puede explicar la presencia de reacciones idiosincráticas de algunos medicamentos, ya que el polimorfismo genético en alguna de las enzimas responsables de su degradación produce metabolitos intermediarios que actúan como tóxicos medulares (figura 15-2).

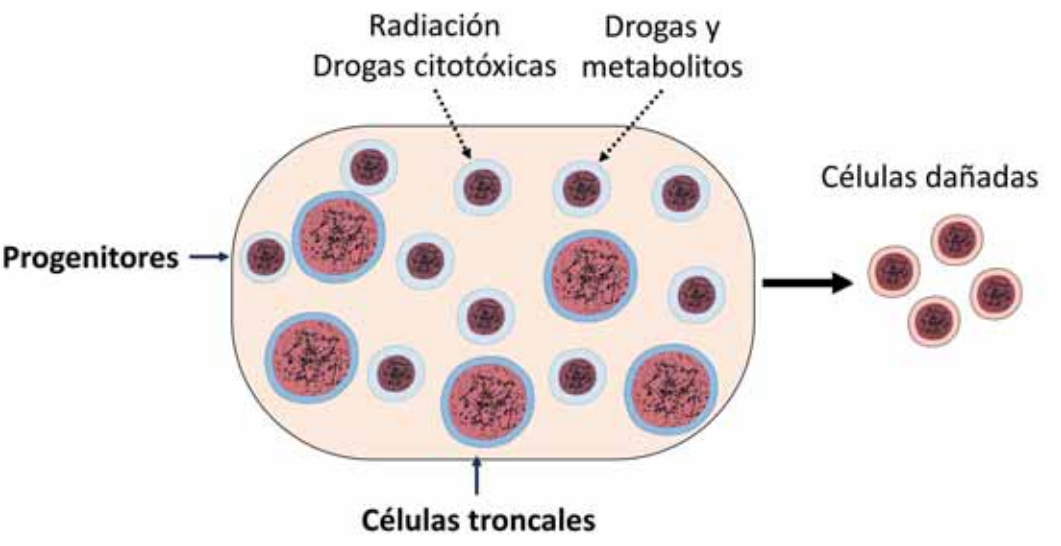


Figura 15-2. Daño a precursores hematopoyéticos por toxicidad directa.

Daño inmunológicamente mediado. El descubrimiento clínico de la mejoría de la pancitopenia en pacientes sometidos TPH que presentaron recuperación autóloga, sugirió que la inmunosupresión a que habían sido sometidos, como parte de su tratamiento de acondicionamiento, permitía la recuperación de la función normal de sus propios progenitores hematopoyéticos, estos hallazgos promovieron el desarrollo del tratamiento inmunosupresor en aplasia medular, además de desarrollar una hipótesis de que el daño de la SC es mediado por activación de una respuesta inmunológicamente mediada. La activación de linfocitos T (LT) es la responsable del daño a nivel medular, los LT activados producen interferón α (IFNα), factor de necrosis tumoral (TNF) e interleuquina 2 (IL-2), todas estas citoquinas son capaces de inhibir la proliferación de células hematopoyéticas y SC quiescentes. IFNα y TNF suprimen la hematopoyesis dañando el ciclo mitótico celular, además ambos inducen la expresión del receptor FAS (CD95) en la membrana de la célula CD34+, la activación de este receptor y su ligando (FA5-L) activa las vías apoptóticas (figura 15-3).

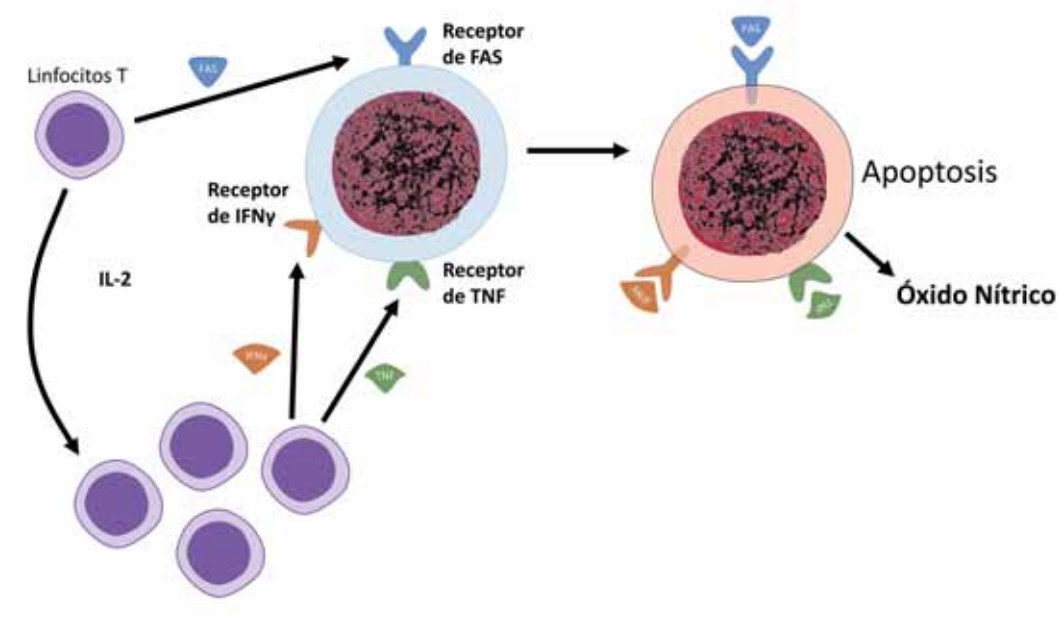


Figura 15-3. Mecanismos inmunes comprometidos en aplasia medular. Linfocitos T citotóxicos (LTc) activados cumplen un importante rol en la destrucción de las células hematopoyéticas, ellos producen citoquinas como interferón γ (IFNγ) y factor de necrosis tumoral TNF los que por acción directa o por activación de receptor FAS desencadena el daño celular. IFNγ a través del factor regulador de interferón 1 (IRF-1) produce la inhibición de la transcripción y detención ciclo celular además de aumentar la producción de óxido nítrico (NO) por activación de óxido nítrico sintetasa inducible, este aumento de óxido nítrico produce daño tóxico en otras células. La activación del receptor FAS a través de FAS ligando desencadena la apoptosis. NOs, NO sintetasa.

Sin embargo, aún no está completamente definido, cuáles son los eventos iniciales que preceden la activación de LT citotóxicos, es posible que exista la participación de LT CD4+ en la mantención de la respuesta, pero aún no es claro cuál es el antígeno inicial que gatilla la activación de esta respuesta.

Uno de los eventos iniciales mejor documentados es la asociación entre virus de la hepatitis y aplasia medular.

La aplasia medular es una complicación infrecuente de la hepatitis, se observa con mayor frecuencia en pacientes con hepatitis diferentes de los grupos A, B, C y G; en estos casos la infección viral gatilla la producción de proteínas virales y de proteínas normales aberrantes, las que son presentadas por una célula presentadora de antígenos a LT, quienes se activan y proliferan produciendo la eliminación de las células infectadas, en algunas ocasiones esta activación persiste produciendo daño autoinmune. En el caso de la aplasia asociada a fármacos, se ha postulado un mecanismo similar.

2.6. Tratamiento y evolución de la aplasia medular

El objetivo primario es mejorar las citopenias, ofreciendo la mejor calidad de vida y expectativa de supervivencia. La evolución de la enfermedad dependerá. de la severidad, de la causa de la AM y de la terapia ofrecida.

Las opciones de tratamiento y el objetivo deseado se deben analizar individualmente con cada paciente. Todos los pacientes con aplasia medular grave o muy grave, y aquellos pacientes con aplasia medular moderada y citopenia grave de al menos una línea, deben iniciar tratamiento.

2.6.1. Tratamiento de soporte

a) Nutrición

Es necesario dar un aporte nutricional adecuado, ya que fácilmente se incrementan los requerimientos basales (infecciones especialmente), y de no ser cubiertos rápidamente llevarán al paciente a una desnutrición. De ser necesario se debe precozmente iniciar nutrición parenteral.

b) Soporte transfusional

El apoyo transfusional de plaquetas y de glóbulos rojos ha significado un importante avance en la sobrevida de los pacientes ya que ha cambiado la causa de muerte de hemorragia a infección. A continuación se detallan los requerimientos transfusionales de los pacientes portadores de AM. Debe destacarse que considerando la alta frecuencia con que estos pacientes requieren transfusiones y considerando el tratamiento definitivo de ellos (ver más adelante), es que todos los esfuerzos del equipo tratante, deben estar enfocados a disminuir el riesgo de secuelas debido a accidentes hemorrágicos y evitar la alosensibilización y disminuir el riesgo de enfermedades transmisibles a través de las transfusiones; por esto, todos los productos deben ser idealmente filtrados e irradiados.

Hemorragia. Se debe transfundir plaquetas si el paciente presenta recuento de 10.000/μL o menor, o si presenta algún sangramiento o un cuadro febril no controlado. Es de elección el uso de plaquetas provenientes de aféresis de donante único, ya que disminuye el riesgo de aloinmunización y de refractariedad a la transfusión de plaquetas.

Otras medidas para evitar el sangramiento incluye una buena higiene dental, cepillos suaves, evitar traumas (suspender deportes violentos o de riesgo). Toda punción para extracción de sangre debe ser seguida de compresión firme por 15 minutos. El sangramiento local puede ser manejado con tratamiento tópico y agentes antifibrinolíticos como el ácido tranexámico, pero en caso de sangramientos mayores no es suficiente. También se debe evitar el uso de fármacos que interfieren con la función plaquetaria, como el ácido acetil salicílico o los antiinflamatorios no esteroidales.

Anemia. La reposición de glóbulos rojos lavados o filtrados para remover los leucocitos y evitar la sensibilización, debe ser efectuada en tanto sea necesario. Inicialmente el paciente puede requerir valores de hemoglobina mayor, alrededor de 9 g/dL, pero posteriormente, como anemia crónica compensada, puede manejarse con valores bajos, incluso de 6 g/dL. La transfusión a largo plazo puede llevar a niveles críticos de sobrecarga de hierro, pudiendo producir daño en el corazón, hígado y sistema endocrino. Los quelantes de hierro deben ser indicados en los pacientes crónicamente transfundidos, antes de que se produzca daño, lo que ocurre habitualmente con alrededor de 50 unidades transfundidas.

c) Infecciones.

Las infecciones siguen siendo la principal causa de mortalidad de los pacientes con aplasia medular por lo que la prevención y tratamiento de las complicaciones infecciosas tienen impacto en el pronóstico de estos pacientes.

Sin embargo, en el contexto de aplasia medular severa, urge la realización de estudios de evaluación del uso de profilaxis infecciosa ya que la mayoría de las recomendaciones han sido adoptadas de estudios realizados en poblaciones de pacientes con periodos prolongados de neutropenia, pero en contexto de enfermedades malignas o trasplante alogénico.

Los pacientes con aplasia medular severa presentan largos periodos de neutropenia profunda, y, por lo tanto, un incremento de riesgo de infecciones fúngicas. Actualmente, no hay recomendaciones establecidas respecto a la cifra de neutrófilos a partir de la cual debería recomendarse administrar profilaxis antifúngica de amplio espectro.

2.6.2. Tratamiento y respuesta

El tratamiento tiene por objetivo restituir la producción de las series hematopoyéticas. Para llegar a esto actualmente existen dos líneas terapéuticas principales, que son el trasplante de médula ósea y la inmunosupresión usando linfoglobulina antitimocítica, ciclosporina y metilprednisolona. En pacientes menores de 20 años con donante familiar HLA idéntico, el TPH se considera el tratamiento de elección en primera línea. Esta indicación se basa en las altas tasas de supervivencia global, superiores al 80-90% en menores de 20 años, el menor desarrollo de EICH crónica en los pacientes más jóvenes y el bajo riesgo de evolución clonal. En caso de disponer de un donante no familiar HLA idéntico y poder realizar un TPH en pocas semanas, se podría considerar este tratamiento como de elección en primera línea. Esta indicación se basa en los datos retrospectivos publicados dentro del Registro Europeo de Aplasia Medular (EBMT).

En pacientes mayores de 50 años el tratamiento de primera línea en la actualidad es el tratamiento inmunosupresor, ya que la supervivencia tras TPH se reduce significativamente a alrededor del 50% a 10 años, debido a un incremento en la incidencia de fallo de injerto y de EICH.

a) Trasplante de progenitores hematopoyéticos. Para el TPH, las células son obtenidas de donantes familiar, con estudio de HLA-A, HLA-B y HLA-DR compatibles. Antes del trasplante al paciente se le hace el acondicionamiento, habitualmente con ciclofosfamida y Timoglobulina, inmunosupresión necesaria para eliminar el factor de autoinmunidad como elemento etiopatogénico, prevenir el rechazo del trasplante y de la enfermedad de injerto contra huésped (EICH).

La recuperación de la médula hematopoyética después del trasplante es rápido, completo y estable. Los rangos de sobrevida pueden ser tan altos como 90%, pero los registros varían entre 75 a 80%, (tabla 15-5). Sin embargo, la sobrevida es edad dependiente (75% en los menores de 20 años, 68% entre los 20 y 40 años, y 35 % en los pacientes mayores de 40 años) en un análisis publicado por Horowitz MM., del International Bone Marrow Transplant Registry. Además de las complicaciones cercanas al momento del trasplante, existen las complicaciones a largo plazo, incluyendo enfermedad pulmonar restrictiva u obstructiva (25%), osteoporosis (18%) y tumor sólido (12%). Todas las complicaciones son más frecuentes en los pacientes que presentan EICH.

b) Tratamiento inmunosupresor. Las indicaciones de inicio de tratamiento inmunosupresor son pacientes con aplasia medular grave o muy grave no candidatos a trasplante alogénico de primera línea y pacientes con aplasia medular moderada que requieren transfusión o presentan sangrados y/o infecciones que limitan su vida normal.

La globulina antilinfocítica (ALG) o antitimocítica (ATG) se usó para el acondicionamiento de los TPH en las AM, pero, G. Mathé observó en 2 pacientes que fueron acondicionados, pero no trasplantados que su médula ósea presentó recuperación. Posteriormente otros trabajos confirmaron la actividad terapéutica, Speck mostró una respuesta de 62% en los pacientes tratados con ATG y posteriormente en 1983 se publicó la superioridad de esta sobre el tratamiento de soporte o de los andrógenos. La respuesta varía entre un 40 y 70%, independiente de la etiología. El mecanismo de acción de este suero sería estimular la producción y liberación de factores de crecimiento por los linfocitos periféricos, pero estos siempre están aumentados en los pacientes con AM. La actividad antilinfocítica directa sería el principal mecanismo de acción. La ATG rápidamente desciende el recuento de los linfocitos, al 10% de lo que había al inicio de la infusión. En la actualidad, el tratamiento estándar es la combinación de ciclosporina y ATG. ATG de caballo presenta mejor respuesta a los 3 y 6 meses de tratamiento y mejor supervivencia global comparado con ATG de conejo.

c) Corticoides. Como agente único en dosis bajas es inefectivo. La metilprednisolona en dosis muy altas produce remisión, pero con alta toxicidad a corto y largo plazo. Actualmente se usa solo en periodos cortos, en dosis moderada, para disminuir el efecto adverso de la ATG, como la anafilaxia y la enfermedad del suero.

d) Ciclofosfamida. Se hizo estudios a dosis baja en 1980, sin respuesta en la mayoría, pero a partir del año 2000 nuevamente se retomaron los estudios, ahora a dosis alta, resultando efectiva, pero con importantes complicaciones, por lo que se suspendió el estudio y se recomendó dejarlo para aquellos pacientes que no respondían a otros esquemas terapéuticos.

e) Anticuerpos monoclonales. Se han estudiado anticuerpos monoclonales dirigidos contra los antígenos de los linfocitos T. A excepción de reportes anecdóticos, nada se ha probado como tratamiento.

f) Ciclosporina A. La ciclosporina A (CsA) es una potente droga inmunosupresora, inhibe la transcripción de genes para IL2, INFγ, y otras citoquinas, bloqueando las etapas centrales de la respuesta inmune. Induciría o mantendría una remisión por interferencia de la producción de citoquinas inhibidoras o por inhibición de la apoptosis de las células hematopoyéticas. Es la única droga que ha demostrado tener eficacia en la AM comparable a la ATG, pero los estudios han demostrado que su efecto es mayor al asociarla a la ATG.

g) Eltrombopag. La trombopoyetina (TPO) es la principal citoquina involucrada en la regulación de la megacariopoyesis y en la producción de plaquetas, y es un ligando endógeno para el receptor de trombopoyetina (R-TPO). Eltrombopag interactúa con el dominio transmembrana del R-TPO humano e inicia las cascadas de señalización similares pero no idénticas a las de la trombopoyetina endógena induciendo la proliferación y diferenciación desde las células progenitoras de la médula ósea. En estudios recientes ha mostrado utilidad en pacientes refractarios a tratamiento.

Independiente del esquema terapéutico usado, la respuesta es lenta con una recuperación de valores dentro de los 3 meses siguientes, solo entonces se hablará de falta de respuesta, debiendo efectuarse un segundo ciclo terapéutico con ATG (en este caso se prefiere usar ATG de origen de conejo).

Como complicaciones tardías se deben mencionar la recaída, que es esperable en un tercio de los pacientes, que afortunadamente responde a un nuevo esquema terapéutico y la dependencia a la CsA, descrita en un 25% de los pacientes que han respondido en primera o segunda cura, pero en la mitad de ellos se puede suspender a largo plazo (5 a 8 años). Las enfermedades hematológicas clonales se presentan en un 25%, como Hemoglobinuria paroxística nocturna, Síndrome mielodisplásico (SMD), Leucemia mieloide aguda y Tumor sólido, que se presentarán a largo plazo.

Finalmente si se comparan lo resultados de TPH versus inmunosupresión la sobrevida a 5 años en algunos trabajos son equivalentes, pero la posibilidad de recaída, la respuesta hematológica a veces es incompleta, los efectos adversos de los fármacos, especialmente renales, dependencia a CsA de algunos pacientes, que es droga de alto costo y el 25% de enfermedad clonal o maligna versus

los pacientes que reciben tratamiento inmunosupresor hace que el TPH sea en los menores de 20 años el tratamiento de elección.

2.9 Hemoglobinuria paroxística nocturna

La hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) es un trastorno adquirido clonal, por el cual la célula madre hematopoyética y, por ende, todas las células derivadas de ella, se hacen vulnerables al ataque del sistema del complemento. Actualmente se han identificado un gran número de mutaciones somáticas en el gen *PIGA* que dan lugar a la aparición de esta entidad.

La HPN tiene tres formas diferentes de presentación: 1) típica, asociada a un fenómeno hemolítico, 2) relacionada con aplasia y 3) subclínica. En estas dos últimas formas, la detección del clon HPN es inferior al 10% o 1% respectivamente.

Diferentes estudios indican que los pacientes que presentan un clon HPN asociado a la aplasia tienen una mayor probabilidad de respuesta al tratamiento inmunosupresor y mejor pronóstico. El desarrollo de estos clones HPN es un efecto relativamente común y temprano en la evolución de la aplasia. Después del tratamiento inmunosupresor, el 15-33% de los pacientes desarrollan signos de HPN a medida que la aplasia se resuelve.

3. APLASIAS MEDULARES HEREDITARIAS Y/O CONGÉNITAS

Aproximadamente un 25% de las aplasias en la infancia son de causa hereditaria o congénitas o forman parte del síndrome de anemia aplásica constitucional, definido por O'Gorman Hughes como una falla medular asociada a anomalías familiares congénitas o trombocitopenia al nacer. La aplasia congénita puede estar asociado a malformaciones o al desarrollo de algunas neoplasias. Es importante reconocer los síndromes predisponentes, diagnosticarlos y tratarlos oportunamente.

Las principales causas congénitas de aplasia en niños son la anemia de Fanconi y la disqueratosis congénita. Aunque el fallo medular en estas patologías suele aparecer en edad pediátrica, algún caso puede manifestarse en pacientes adolescentes o adultos jóvenes. Con menos frecuencia también se ha asociado a pancitopenia el síndrome de Shwachman-Diamond, la anemia de Diamond-Blackfan, algunas formas de trombopenia amegacariocítica y la deficiencia de GATA2.

La tabla 15-5 muestra los síndromes más frecuentes y su herencia.

Tabla 15-5. Genes asociados a aplasia medular congénita

Enfermedad	Gen	locus	%
Anemia de Fanconi	FANCA	16q24.3	70
	FANCB*	N/I	raro
	FANCC	9q22.3	10
	FANCD1*	N/I	raro
	FANCD2	3p25.3	raro
	FANCE	6p21.3	10
	FANCF	11p15	raro
	FANCG	9p13	10
Anemia de Blackfan-Diamond	RPS19	19p13.3	25
	N/I	8p23.2-p22	35
	N/I	N/I	40
Disqueratosis congénita	DKC1	Xq28	Lig cr X
	DKC2	3q21-28	Dominante
Síndrome de Shwachman-Diamond	N/I	7q1.1	100
Neutropenia congénita severa	ELA2	19p13.3	90
Trombocitopenia Amegacariocítica	c-Mpl	1p35	100
Trombocitopenia con ausencia de radio	N/I	N/I	N/I
Síndrome de Pearson	DNA mitocondrial Deleción de 2 a 8 kb		100

N/I: no identificado,* aún no ha sido clonado

3.1. Anemia de Fanconi

La anemia de Fanconi es la causa más frecuente de insuficiencia medular congénita. Se trata de un síndrome caracterizado por citopenias, malformaciones y alto riesgo a presentar cáncer, principalmente leucemia aguda, síndromes mielodisplásicos y tumores sólidos tipo carcinoma escamoso. La forma de presentación más habitual es la trombopenia y/o macrocitosis. Sin embargo, no es raro que se detecte una pancitopenia de forma inicial. La gran mayoría de los pacientes se diagnostican antes de los 16 años, pero hay casos diagnosticados en adolescentes y adultos jóvenes, con una mediana de edad de presentación de 8 años. La relación entre hombres y mujeres es 1,2:1.

La AF es una enfermedad autosómica recesiva compleja, fenotípicamente heterogénea, más frecuente en grupos proclives a endogamia como judíos ashkenazi y africanos (1/90). En 1982 se creó un Registro Internacional de AF en la Universidad Rockefeller y se ha estimado que su frecuencia en EEUU y Europa es de 1 recién nacido entre 300 nacimientos.

Se asocia a inestabilidad cromosómica ocasionada por mutaciones en genes responsables de la reparación del ADN. Hasta la fecha se han descrito 22 genes implicados, siendo el más frecuente las alteraciones que afectan a FANCA. La mayoría de los casos sigue un patrón de herencia recesiva.

Las manifestaciones de este síndrome al nacer han sido reportadas en el 70% de los pacientes, y en orden de frecuencia decreciente son: hiperpigmentación cutánea o manchas café con leche, talla baja, hipoplasia o ausencia de pulgar con o sin ausencia de radio, criptorquidea e hipogonadismo en los hombres, microcefalia, microftalmia y estrabismo, malformaciones renales (riñón en herradura), bajo peso de nacimiento, retraso del desarrollo psicomotor, sordera y otras. Existe un 30% de pacientes con Anemia de Fanconi (AF) que no tienen ninguna manifestación somática y debutan como AM.

Considerando que existe una serie de patologías con expresión fenotípica similar a AF, es necesario realizar estudios de laboratorio que entreguen un diagnóstico de certeza. Los estudios que permiten un diagnóstico certero, son la búsqueda de quiebres cromosómicos espontáneos o inducidos y la secuenciación de nueva generación (NGS). Las células de los pacientes con AF muestran tendencia a presentar quiebres cromosómicos espontáneos o provocados por agentes inductores de entrecruzamiento del DNA como son: diepoxibutano (DEB) y mitomicina C (MMC) (figura 15-4).

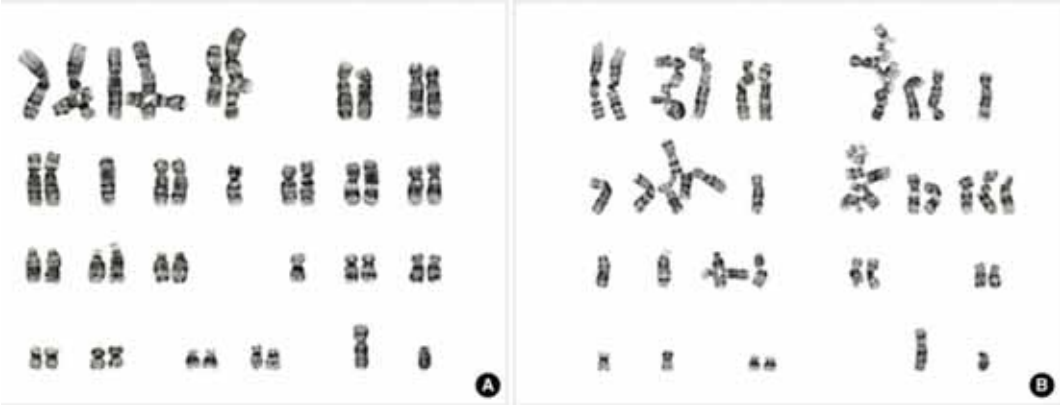


Figura 15-4. Cariograma característico de paciente con anemia Fanconi. Hallazgos citogenéticos de una prueba de rotura cromosómica con (A) DEB (diepoxibutano) y (B) MMC (mitomicina C) en un cultivo de linfocitos de sangre periférica.

Las lesiones cromosómicas pueden ser: roturas, reordenamientos, intercambios y endorreduplicaciones. La fragilidad cromosómica puede efectuarse en linfocitos de sangre periférica, fibroblastos y en células fetales de las vellosidades coriónicas, es una prueba sensible, específica y reproducible que tiene valor diagnóstico incluso en los pacientes en que no se ha desarrollado ninguna citopenia.

Aproximadamente entre un 10-15% puede ser normal en las AF con mosaicismo somático en que las células hematopoyéticas sufren una corrección génica. En estos casos, es recomendable realizar el estudio de fragilidad cromosómica en fibroblastos de la piel. Paralelamente, es necesario realizar un cultivo sin MMC o DEB que permita el análisis del cariotipo del paciente. Alteraciones citogenéticas como -Y, del(5q), del(11q) y del(20q), no han sido asociadas a un mayor riesgo de trasformación leucémica. Sin embargo, alteraciones como +3q y del(7q) o cariotipos complejos sí se relacionan con evolución de la enfermedad a estadios más agresivos.

En el análisis genético, puede realizarse un análisis mutacional de los genes FANC, aunque no es imprescindible para su diagnóstico clínico. Debido al alto número de genes FANC, su estudio es únicamente abordable mediante un panel multigen y tecnología NGS. La presencia de 2 mutaciones, una en cada uno de los dos alelos de un gen FANC, es el patrón autosómico recesivo más común para el desarrollo de esta enfermedad. A nivel de médula ósea, anomalías en RUNX1, se han asociado a un mayor riesgo de transformación Leucémica.

La afectación del gen FANCA, es la más frecuente. Estudios recientes han establecido cierta correlación entre el tipo de mutación y el comportamiento de la enfermedad. Por este motivo los pacientes FANCA en los que hay ausencia de expresión de una proteína y los pacientes FANCG constituyen un grupo de alto riesgo con peor evolución hematológica y mayor número de malformaciones. La terapia génica aún está en estudio, pero podría ser el futuro del tratamiento de esta enfermedad. Evidencias clínicas sugieren que el producto de los genes A, C, E, F y G forman un complejo nuclear que participa junto a una proteína D2 en la reparación del DNA que es defectuoso produciendo así 2 proteínas BRCA1 y BRCA2, ellas también pueden ser encontradas en otras patologías que se caracterizan por quiebres cromosómicos como: ataxia telangiectasia, síndrome Bloom, Xeroderma Pigmentoso, entre otras (figura 15-5).

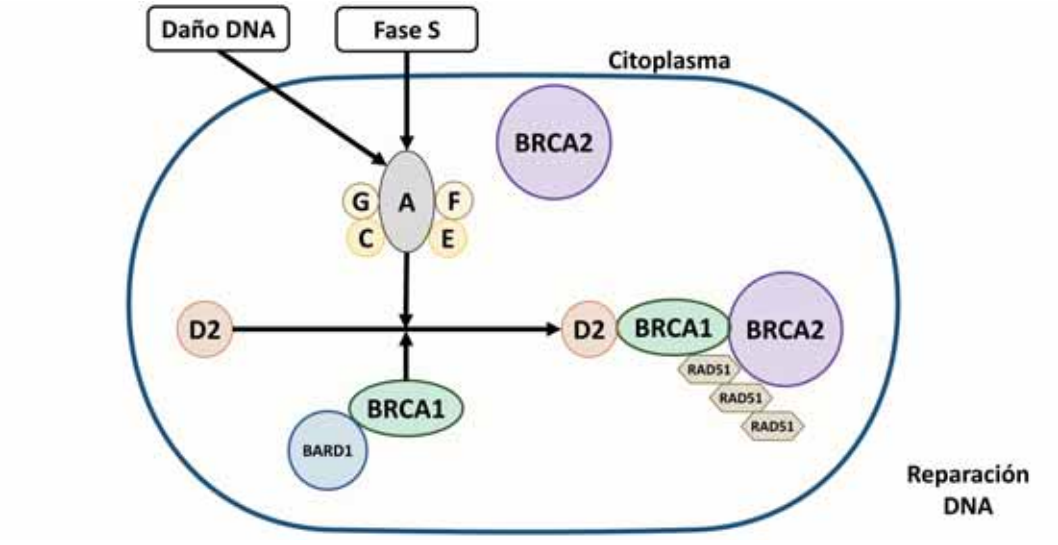


Figura 15-5. Interacción de proteína BRCA en la Anemia de Fanconi.

La complicación más frecuente que compromete la vida es la falla medular que se presenta en el 90% de los pacientes, generalmente aparece en la primera década de la vida, manifestada por trombocitopenia, neutropenia, anemia macrocítica y una médula ósea hipocelular. En la fase previa, aparece macrocitosis y aumento de la hemoglobina fetal. El manejo de la anemia aplásica está indicada cuando la Hb cae bajo 8 g/dL o se hace sintomático, plaquetas menor a 30.000/µL, y/o neutrófilos menor a 500/µL. El tratamiento de elección es el TPH, sin embargo no previene el desarrollo de tumores sólidos. El acondicionamiento debe ser ajustado por la gran toxicidad al usar dosis habituales debido a su fragilidad cromosómica disminuyendo las dosis de ciclofosfamida y radioterapia, incluso algunos grupos han reemplazado la radioterapia por dosis más altas de ciclofosfamida o busulfan con buenos resultados. La sobrevida con trasplante de médula ósea es mayor a un 70% con donante familiar idéntico y menos de un 40% con donante alternativo. Los pacientes que no tienen un donante familiar idéntico pueden ser tratados con andrógenos orales, más del 50% responden a esta terapia, su problema son los efectos adversos como: virilización, disfunción hepática y tumores hepáticos (3% de las AF). Los tumores hepáticos son adenomas y hepatomas, por esto, deben tener un seguimiento y control estricto con estudio de función hepática y ecotomografías periódicas. Si el paciente desarrolla efectos secundarios severos al uso de andrógenos debe ofrecerse un donante alternativo.

Alrededor del 6% de los pacientes con AF desarrollan SMD caracterizado por: citopenias, dismielopoyesis, diseritropoyesis y megacariocitos anormales, asociado a veces a clones con citogenética anormal. Esto último puede presentarse en pacientes con AF sin manifestaciones de mielodisplasia y no siempre se transforman en leucemia.

El 10% de los portadores desarrollan una leucemia que generalmente es mieloide aguda y de ellas solo un 10% han debutado como SMD y un 25% no tiene antecedentes de aplasia previa ni de AF. Su tratamiento es complicado ya que los esquemas de quimioterapia convencional provocan una alta toxicidad al dañar el DNA y no poder repararlo en forma adecuada en la célula normal, pueden ser tratados con TPH, pero a pesar de esto la mayoría fallece el primer año del debut de la enfermedad.

De los pacientes que no manifiestan una AM, SMD o leucemia, existe el riesgo de desarrollar un tumor sólido, lo que ocurre en un 5% de los casos. Estos tumores comprometen habitualmente cara y cuello, esófago, vulva, cervix uterino, piel (no melanoma), SNC y otros sitios con menos frecuencia. Estos tumores los presentan alrededor de la tercera década de la vida, un 25% no tienen el diagnóstico de AF. En general los pacientes que presentan un tumor sólido viven alrededor de 30 años, debido a la toxicidad de la quimioterapia y radioterapia; solo ayuda la cirugía cuando es posible efectuarla a tiempo.

Los pacientes que desarrollan AM o leucemia y que son curados por un TPH, tienen aumentado el riesgo de un cáncer secundario. En algunas series clínicas ha

llegado a ser de un 24% a los 8 años del TPH; los órganos más comprometidos han sido la lengua o piso de la boca.

Las recomendaciones para el control de un paciente con AF son control con hemograma cada 3 meses, mielograma, biopsia de médula ósea y citogenética anual, para pesquisar precozmente SMD, leucemias y aplasia. Las malformaciones deben ser corregidas lo antes posible con apoyo transfusional si fuera necesario. Los pacientes en tratamiento con andrógenos orales deben también controlarse cada 2 a 3 meses con pruebas hepáticas y ecotomografía anual. También deben controlarse en forma dirigida en busca de tumores de cabeza y cuello anualmente todos los pacientes con más de 10 años o todo paciente trasplantado después del primer año de este tratamiento; debe incluirse un examen minucioso de boca y faringe. Endoscopía esofágica en el adulto joven. Examen ginecológico después de la menarquia o 16 años. Debe evitarse el uso de tabaco, alcohol y exposición al sol.

3.2. Disqueratosis congénita

La disqueratosis congénita (DC) es una enfermedad producida por mutaciones en genes implicados en el mantenimiento de la longitud de los telómeros. Los genes más frecuentemente mutados son DKC1 (ligado al X), TERC y TERT, aunque también están descritas mutaciones a otros niveles.

Actualmente, aproximadamente un 70% de los pacientes pueden ser caracterizados genéticamente. Las manifestaciones clínicas son variables y se describe una tríada clásica: (a) hiperpigmentación reticulada en cara, cuello, hombros, (b) uñas distróficas, que aparecen en la primera década de la vida, y (c) leucoplaquias en mucosa oral que se presentan en la segunda década, y además en el 50% de los pacientes aparece AM y un 10% desarrollan una neoplasia entre la tercera y cuarta década de la vida.

La disqueratosis congénita se hereda de 3 formas: recesiva ligada al cromosoma X, autosómica recesiva y dominante, se han descrito en la literatura más de 200 casos clínicos y aproximadamente 50 de ellos son de 7 familias. La triada clásica aparece entre los 5 y 10 años de vida, un 20% de los pacientes desarrollan complicaciones pulmonares con disminución de la capacidad de difusión y defectos restrictivos. Tienen alteraciones oculares que incluyen epífora por bloqueo del conducto lacrimal, blefaritis, pérdidas de pestañas, úlceras, ectropión y conjuntivitis. Son frecuentes las caries y pérdidas dentales. El cabello se cae en forma prematura y se torna grisáseo. Además tienen retardo de crecimiento, talla baja, alteraciones en el aprendizaje y retardo mental, microcefalia, hiperhidrosis, y alteraciones óseas (osteoporosis, necrosis avascular y escoliosis).

La aplasia suele aparecer con una mediana de edad de 11 años, en más del 30% de los pacientes con herencia ligada al cromosoma X (llegando a un 94% a los 40 años), en más de la mitad de los autosómicos recesivos y rara vez en los autosómicos dominantes.

Los hallazgos de laboratorio son similares a la AF, pero la fragilidad cromosómica es normal, los progenitores hematopoyéticos se encuentran disminuidos o ausentes y los factores estimulantes de colonias no son efectivos. Las diferentes mutaciones pueden verse en la tabla 15-5.

En la disqueratosis congénita en su forma ligada al cromosoma X, se han identificado múltiples mutaciones del gen DKC1, el cual codifica una proteína nucleolar llamada disqueratina, cuyo rol aún no está definido, pero se cree que está relacionado con el ensamblaje del RNA ribosomal. Esta proteína se une a la telomerasa y determina la longitud del telómero, el que se encuentra acortado en esta enfermedad. La AM en la disqueratosis se debe a insuficiencia de la telomerasa.

Esta enfermedad generalmente es mortal por el desarrollo de aplasia, cáncer o las complicaciones de su tratamiento. El 70% de las muertes se deben a la aplasia, 10% a las complicaciones pulmonares, 8% a neoplasias (SMD, leucemia mieloide aguda y carcinomas). No existe cura para esta enfermedad, el TPH, solo mejora a un 30% de los pacientes, independiente del tipo de donante. Puede usarse esteroides anabólicos y factores estimulantes de colonias con efectos transitorios.

3.3. Síndrome de Shwachman-Diamond (SSD)

Es una rara enfermedad autosómica recesiva, con una incidencia aproximada de 1 cada 100.000 nacimientos y con una afectación hombre:mujer de 1,7:1.

Cursa con compromiso multisistémico, caracterizado por insuficiencia pancreática exocrina, falla medular, alteraciones esqueléticas y talla baja. El síndrome de mala absorción está presente precozmente, y más del 40% desarrollan una aplasia medular.

El diagnóstico se basa en niveles bajos de tripsinógeno, grasa pancreática y disostosis metafisiaria. Se ha identificado el gen SBDS como gen responsable del SSD. Este gen se ha localizado a nivel del cromosoma 7, en el locus 7q11.

El recuento de neutrófilos es inferior a 1500/µL, y la evolución de la neutropenia puede ser crónica, intermitente o cíclica, también se puede desarrollar trombocitopenia y anemia. El mielograma es hipocelular con escasa formación de unidades formadoras de colonias. La evaluación citogenética no muestra quiebres cromosómicos.

Entre 5-10% de los pacientes de sexo masculino pueden presentar leucemia, la mayoría mieloide. También pueden presentar SMD en el 10%, alteraciones citogenéticas con anomalías clonales que involucran al cromosoma 7.

El pronóstico vital es mejor que los pacientes con AF. El tratamiento se hace con reemplazo de enzimas pancreáticas orales. La neutropenia puede mejorar con

factor estimulante de colonia de granulocitos. Cuando desarrollan una aplasia severa está indicado el TPH y su éxito es de un 50% con donante no relacionado.

3.4. Hipoplasia cartílago-pelo

Es una enfermedad autosómica recesiva que se caracteriza por condrodisplasia con disostosis metafisial, extremidades cortas asociadas a manifestaciones hematológicas como neutropenia, anemia macrocítica y linfopenia, e inmunodeficiencias.

El diagnóstico de la hipoplasia de cartílago-pelo se establece por talla baja disarmónica, fémur y tibia incurvados, falanges cortas y engrosadas, laxitud de ligamentos con característica limitación a la extensión de los codos y pelo ralo, inicialmente descrito en población amish estadounidense. Es debido a mutaciones en el gen RMRP (localizado en el cromosoma 9p13): gen nuclear no codificante que transcribe para una cadena de ARN que forma parte del complejo mitocondrial-RNasa-RMP participando en el ensamblaje de los ribosomas y en la progresión del ciclo celular. Con patrón de herencia recesiva, la severidad de las mutaciones da lugar a una clínica muy variada (de más leve a más grave).

Tiene 7 veces más riesgo de desarrollar cáncer. En caso de inmunodeficiencia combinada severa, evolución a síndrome mielodisplásico o leucemia se debe considerar el trasplante de progenitores hematopoyéticos.

3.5. Síndrome de Pearson

Es un trastorno multisistémico causado por reordenamientos a gran escala del ADN mitocondrial (ADNmt), con los consiguientes defectos en la cadena respiratoria mitocondrial. Típicamente consiste en anemia refractaria sideroblástica con vacuolización en precursores hematopoyéticos medulares, acidosis láctica y disfunción pancreática exocrina; la anemia se asocia frecuentemente con un grado variable de trombocitopenia y neutropenia. Otras manifestaciones reportadas incluyen miopatía proximal, síntomas neurológicos (convulsiones, ataxia, trastornos del movimiento), lesiones cutáneas y acidosis tubular renal proximal. Según los informes, la mayoría de los pacientes fallecen antes de los 3 años de edad.

3.6. Disgenesia reticular

Es un desorden muy raro, autosómico recesivo que se caracteriza por ausencia congénita de monocitos y neutrófilos, linfopenia y ausencia de inmunidad celular y humoral. El TPH puede ser efectivo para su mejoría.

3.7. Trombocitopenia amegacariocítica

Esta enfermedad se caracteriza por trombocitopenia de aparición precoz, en periodo de lactante con ausencia de malformaciones o asociación con otros

síndromes. Puede tener anemia macrocítica y cerca de la mitad progresan a AM. En el mielograma se puede observar una celularidad normal con disminución o ausencia de megacariocitos, el nivel de trombopoyetina está elevado. El test de fragilidad cromosómica es normal. Esta enfermedad se debe a una mutación en el gen del receptor de la trombopoyetina, (c-mpl) el cual se localiza en brazo corto del cromosoma 1 (1p35). Su herencia es autosómica recesiva. La aplasia medular aparece alrededor de los 3 años de vida y se corrige con TPH; ocasionalmente pueden presentar leucemia. El diagnóstico prenatal se hace con la detección en sangre fetal de trombocitopenia y el análisis del DNA.

3.8. Anemia Blackfan-Diamond (ABD)

Es una enfermedad congénita rara, con una incidencia de 7 casos por 1 millón de nacidos vivos.

Fue la primera ribosomopatía descrita y es un síndrome de insuficiencia de la médula ósea hereditaria constitucional. La eritroblastopenia es la principal característica de la enfermedad, que es un modelo para las enfermedades ribosómicas, relacionadas con una variación alélica heterocigota en 1 de los 20 genes de proteínas ribosómicas de la subunidad ribosómica pequeña o grande. La característica sobresaliente de la forma clásica es un defecto en la maduración del ARN ribosómico que genera estrés nucleolar, lo que resulta en la detención del ciclo celular y la apoptosis.

Un 25% presenta herencia autosómica recesiva o dominante, aunque la mayoría son casos esporádicos. Estos casos esporádicos se han descrito como autosómicos dominante con diferente penetrancia.

El diagnóstico se establece a una edad media de 2 a 3 meses, el 95% de los casos son diagnosticados antes de los 2 años de edad y el 99% antes de los 5 años de edad.

Las anomalía físicas encontradas en estos pacientes son: facie típica, paladar ojival, labio leporino, micrognatia, hipertelorismo, estrabismo, ptosis palpebral, epicantus, glaucoma, cataratas, cuello corto, fenotipo turner. También se pueden encontrar malformaciones cardiacas, genitourinarias y esqueléticas.

La anemia puede llegar a valores de Hb< 1,5 g/dL, esta anemia es macrocítica con aumento de Hb fetal y antígeno i fetal. El mielograma presenta celularidad conservada con ausencia o marcada reducción de progenitores de la serie roja. Los niveles de eritropoyetina, hierro sérico, ferritina, ácido fólico, y vitamina B12 están en valores normales o elevados. Además de altos niveles de adenosin deaminasa (ADA) en los glóbulos rojos. La fragilidad cromosómica es normal.

La médula ósea muestra un número de progenitores hematopoyéticos reducido aunque las unidades formadoras de colonias pueden estar aumentadas con altos niveles de eritropoyetina; estas células muestran apoptosis acelerada. No

se han encontrado mutaciones en c-kit, SCF, ni en genes del receptor de eritropoyetina.

El diagnóstico diferencial más importante es con la Eritroblastopenia transitoria de la infancia, una enfermedad que aparece después de los 2 años de vida, no se asocia a malformaciones y hasta un 20% puede tener asociación con neutropenia. El ADA de los eritrocitos es normal, de volumen corpuscular (VCM), Hb fetal, antígeno i son normales; el nivel de Hb vuelve a su valor normal entre 1 a 2 meses de su aparición, no se ha encontrado una causa precisa y requiere de transfusión generalmente en una ocasión.

Pacientes con traslocación X, 19 o síndromes de microdeleciones que compromete la zona 19q13,2 que expresa el gen RPS19 y codifica una proteína ribosomal subunidad 19 (tabla 15-5), han sido identificadas en un 25% de los pacientes con Anemia de Blackfan-Diamond El rol en la eritropoyesis no ha sido aclarado aún. El gen RPS19 fue el primer gen identificado, y estudios posteriores en cohortes muy grandes de pacientes encontraron que su frecuencia era de ~25% en pacientes afectados por ABD. Este gen fue descubierto a finales de la década de 1990 en el estudio de un una niña sueca de 7 años que portaba una translocación cromosómica equilibrada [46, XX, (X;19)(p21;q13)] alterando el gen RPS19. El trabajo exhaustivo posterior a principios de la década de 2000 condujo a la identificación de mutaciones en un gran conjunto de genes ribosómicos que codifican constituyentes proteicos de subunidades ribosómicas pequeñas y grandes. De hecho, el RPL5 (7% de los casos de ABD), RPL11 (5%), RPL35a (3,5%), RPS24 (2,4%), RPS17 (1%), RPS10 (3%), y RPS26 (7%).

Puede efectuarse diagnóstico prenatal por la determinación con ecodopler de anemia in útero, y obtener muestra por cordocentesis para buscar la mutación RPS19.

Al nacer y durante la infancia, el nivel de hemoglobina (Hb) puede ser normal o inferior a lo normal, pero la necesidad de transfusión comienza en el primer año de vida en el 90% de los pacientes. El consenso internacional es no usar glucocorticoides antes del año de edad, y esto puede retrasarse aún más en niños con falla de crecimiento grave. El umbral para la transfusión es de 8.0 a 9.0 g/dL.

En niños mayores a 1 año de edad, los glucocorticoides deben analizarse a la dosis estándar de 1-2 mg/kg. En los respondedores, el aumento de los reticulocitos se observa en el día ~10, y el valor de Hb alcanzará los valores normales dentro de 1 mes. No hay evidencia clínica que apoye el tratamiento prolongado a esta dosis en pacientes sensibles, y los glucocorticoides deben reducirse gradualmente después del aumento de reticulocitos para definir la dosis mínima. En general, del 50% al 60% de los pacientes responden a largo plazo a los corticoides. Sin embargo, la calidad de la respuesta varía. Algunos pacientes alcanzan un nivel normal de Hb con una dosis muy baja de esteroides (<0,15 mg/kg por día), y algunos necesitan una dosis más alta para mantener el nivel de Hb justo por encima del umbral de transfusión. En los países con un buen apoyo

transfusional, la dosis máxima tolerada de esteroides se considera de 0,3 mg/kg por día, y los pacientes que requieren una dosis más alta deben ingresar a un programa de transfusión frecuente. Este umbral puede aumentarse a 0,5 mg/kg por día en países en los que no se garantizan transfusiones seguras de glóbulos rojos. Cabe señalar que la ABD es la única enfermedad humana en la que se administran esteroides durante años, y tanto la eficacia como los efectos adversos deben evaluarse regularmente. La resistencia a los esteroides ocurre en el 35% de los casos. Estas personas deben recibir terapia de transfusión de glóbulos rojos y son candidatos para el trasplante de células madre hematopoyéticas; este último, es actualmente la única opción para curar el defecto eritroide de la ABD y debe considerarse de forma precoz para los niños con dependencia de transfusiones. Un informe reciente del grupo francés y alemán incluyó a 68 niños (mediana de edad: 5,2 años; rango: 0,9–16,8 años); los donantes fueron hermanos (n = 46), no emparentados (n = 27). En esta cohorte, la supervivencia global fue del 91%, sin diferencias según el tipo de donante.

3.9. Neutropenia Congénita Severa

Es una enfermedad autosómica dominante, caracterizada por la presencia de infecciones bacterianas recurrentes desde los primeros meses de su vida asociada a recuentos de neutrófilos inferiores a 200/µL. La primera descripción de este síndrome fue efectuada en el año 1956 por Kostmann. La alteración genética que conduce a la enfermedad se encuentra localizada en el gen 2 de la elastasa (ELA2) el que sufre una mutación heterocigota. En los precursores mieloides se ha descrito además heterocigocidad para la activación de la mutación ras y mutación del receptor del G-CSF, lo cual se relaciona con el desarrollo de neoplasias hematopoyéticas.

Se caracteriza por una neutropenia marcada, aunque los eosinófilos y monocitos pueden estar aumentados. En la médula ósea se observa una celularidad conservada con ausencia o disminución de progenitores mieloides o una detención de la maduración en los mielocitos o promielocitos. En estudios in vitro, la mielopoyesis se corrige al agregar G-CSF, lo que ha permitido el uso terapéutico de este factor. Antes del uso de G-CSF los pacientes fallecían antes de los 3 años de vida debido a infecciones piógenas; desde 1989 ha sido posible su uso en forma rutinaria¸ la dosis recomendada es entre 5-10 mg/kg/día con un éxito del tratamiento de un 90%. Al aumentar la sobrevida en este grupo de pacientes, se ha encontrado un riesgo mayor de desarrollar neoplasias hematológicas como leucemias mieloides (13%) y SMD (7%), el desarrollo de estas enfermedades se asocia con más frecuencia a la presencia de monosomía 7, la que puede estar desde el diagnóstico, o aparecer en el curso de la enfermedad. El TPH está indicado en los pacientes que no responden al G-CSF o presentan alteraciones citogenéticas. El diagnóstico prenatal se basa en buscar la mutación ELA2.

3.10. Trombocitopenia con ausencia de radio (TAR)

Es un síndrome genético raro que ocurre con una frecuencia de aproximadamente 0,42 casos por cada 100.000 nacidos vivos. Se caracteriza por trombocitopenia hipo-megacariocítica con radios bilaterales ausentes y la presencia de ambos pulgares. La trombocitopenia es inicialmente muy grave, manifestándose en las primeras semanas a meses de vida, pero posteriormente mejora con el tiempo para alcanzar valores cercanos a lo normal a los uno o dos años de edad. Otros hallazgos clínicos son: anomalías en los dedos, ausencia o anomalía del cúbito, húmero anormal, extremidades cortas, cardiopatía congénita y alteraciones gonadales. Un 20% presenta alergia a la proteína de la leche de vaca.

El recuento de plaquetas es <50.000/µL al diagnóstico, anemia secundaria a sangrado y más de un tercio tienen leucocitosis (> 40000/µL) debido a una reacción leucemoide transitoria. Al examen físico se encuentra esplenomegalia por eritropoyesis extramedular. La médula ósea tiene celularidad conservada pero, con ausencia o anormalidad de megacariocitos. Presentan fragilidad cromosómica y cultivos hematopoyéticos normales para la serie eritroide y mieloide con ausencia de colonias de megacariocitos. Los niveles de trombopoyetina están elevados con una trombocitopenia amegacariocítica. Su herencia es autosómica recesiva, la etiología del síndrome TAR es desconocida, sin embargo, un estudio realizado por Klopocki et al. demostró que todos los individuos nacidos con síndrome TAR poseían una microdeleción de la región de 200 kb en la banda cromosómica 1q21.1. Esta microdeleción en el brazo largo (q) del cromosoma 1 generalmente implica la deleción de un gen llamado gen RBM8A. Sin embargo, esta microdeleción por sí sola no es suficiente para causar la aparición del síndrome TAR. El síndrome generalmente ocurre cuando la microdeleción del cromosoma 1q21.1 se asocia con otra anomalía genética.

El pronóstico es mejor que otros síndromes de falla medular congénita; muchos pacientes mejoran después del primer año de vida, aunque requieren durante este período múltiples transfusiones para mantener el recuento de plaquetas sobre 10000/µL. Actualmente su sobrevida es del 75% a los 4 años. El trasplante es un tratamiento excepcional en esta patología. Muy rara vez desarrollan alguna neoplasia aunque han sido descritas .

El diagnóstico prenatal se hace con la búsqueda de las malformaciones del radio asociado a trombocitopenia fetal.

4. LECTURAS SUGERIDAS

Wilson, D. B., Link, D. C., Mason, P. J. & Bessler, M. Inherited bone marrow failure syndromes in adolescents and young adults. Ann. Med. 46, 353–363, 2014.

Dufour, C. How I manage patients with Fanconi anaemia. Br. J. Haematol. 178, 32–47, 2017.

Cheung, R. S. & Taniguchi, T. Recent insights into the molecular basis of Fanconi anemia: genes, modifiers, and drivers. Int. J. Hematol. 106, 335–344, 2017.

Savage, S. A. & Dufour, C. Classical inherited bone marrow failure syndromes with high risk for myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukemia. Semin. Hematol. 54, 105–114, 2017.

Da Costa, L., Leblanc, T., & Mohandas, N. Diamond-Blackfan anemia. Blood, 136(11), 1262–1273, 2020.

Grupo español de trasplante hematopoyético y terapia celular. Guía para el diagnóstico y tratamiento de las insuficiencias medulares, 2019.

Hartung HD, Olson TS, Bessler M. Acquired aplastic anemia in children. Pediatr Clin North Am. 60(6):1311-1336, 2013.

León, Pilar et al. Aplasia medular adquirida, experiencia en un hospital público de referencia. Rev. méd. Chile [online].vol.146, n.2 [citado 2021-11-05], pp.175-182. 2018.

Georges GE, Doney K, Storb R. Severe aplastic anemia: allogeneic bone marrow transplantation as first-line treatment. Blood Adv. Aug 14;2(15):2020-2028. 2018.

Alter, B. "Bone marrow failure syndromes in children". The Pediatrics Clinics of North America 49: 973-988, 2002.

Faivre, L., Guardiola, P., Lewis, C., et al. "For the EUFAR Association of complementation group and mutation type with clinical outcome in Fanconi anemia". Blood; 96:4064-70, 2000.

Keung, Y.K., Penatti, M.J., Cruz, J.M., Powell, B.L. et al. "Bone marrow cytogenetic abnormalities of aplastic anemia". Am J Hematol.; 66(3): 167-71, 2001.

Marsh, J.C. "Haematopoietic growth factors in the patogénesis and for the treatment of aplastic anemia". Semin Hematol.; 37:81-90, 2000.

Young, N. "Acquired aplastic anemia". Ann of Intern Med; 136 : 534-546, 2002.

Capítulo

16

LEUCEMIAS AGUDAS

Lilian Pilleux Cepeda

Resumen

1. Introducción

2. Leucemia linfoblástica aguda
- 2.1. Introducción
- 2.2. Patogenia
- 2.3. Cuadro clínico
  - 2.3.1. Aspectos generales
  - 2.3.2. Falla medular
  - 2.3.3. Síntomas constitucionales e infiltrativos.
  - 2.3.4. Compromiso osteoarticular.
  - 2.3.5. Compromiso sistema nervioso central y otros sitios santuarios.
  - 2.3.6. Hiperleucocitosis
  - 2.3.7. Complicaciones Metabólicas
- 2.4. Laboratorio
  - 2.4.1. Aproximación inicial
  - 2.4.2. Estudios de especialidad

2.5. Clasificación LLA
  2.5.1 Según morfología
  2.5.2 Según inmunofenotipo
  2.5.3 Según citogenética y biología molecular
2.6. Factores pronósticos
2.7. Diagnóstico diferencial
2.8. Tratamiento de LLA
  2.8.1. Terapia de soporte
  2.8.2. Quimioterapia
  2.8.3. Trasplante de Progenitores Hematopoyéticos
  2.8.4. Resultados de tratamiento de LLA
  2.8.5. Complicaciones del tratamiento de LLA

3. Leucemia mieloblástica aguda

3.1. Introducción
3.2. Epidemiología
3.3. Etiología
3.4. Cuadro clínico
  3.4.1. Compromiso medular
  3.4.2. Infiltración extramedular
  3.4.3. Síndrome hemorragíparo
3.5. Laboratorio
  3.5.1. Exámenes generales
  3.5.2. Exámenes de especialidad
3.6. Clasificación de las LMA
  3.6.1. Según criterios FAB
  3.6.2. Según criterios OMS
3.7. Factores Pronósticos
3.8. Diagnóstico Diferencial
3.9. Tratamiento
  3.9.1. Medidas generales.
  3.9.2. Quimioterapia convencional.
  3.9.3. Tratamiento Leucemia Promielocítica Aguda.
  3.9.4. Trasplante de progenitores hematopoyéticos
  3.9.5. Nuevas terapias.

4. Lecturas sugeridas

RESUMEN

Las leucemias agudas son cánceres derivados de células troncales y/o progenitoras hematopoyéticas que tienen una alta velocidad de duplicación, por lo que sin tratamiento son rápidamente fatales en el curso de días o semanas. Desde el punto de vista médico constituyen una urgencia oncológica y por ello se debe actuar en consecuencia ante su sospecha. Se clasifican en linfoblástica y mieloblástica, según su estirpe de origen. Se pueden presentar a cualquier edad, pero su incidencia varía mucho, siendo la leucemia linfoblástica aguda más frecuente en niños y la leucemia mieloblástica aguda en adultos. Su causa es aún desconocida, aunque se ha avanzado bastante en la comprensión de las alteraciones genéticas y moleculares presentes que llevan a la proliferación neoplásica. El diagnóstico debe sospecharse ante un cuadro clínico compatible con falla medular y un laboratorio con pancitopenia o leucocitosis con presencia de blastos en sangre. Puede también presentarse con complicaciones como sepsis severa, síndrome de lisis tumoral o compromiso de sistema nervioso central. Su estudio requiere una exploratoria que incluye morfología de médula ósea, citogenética y biología molecular, los cuales permiten estratificar un caso en particular en grupo de riesgo y según ello diseñar la estrategia terapéutica. Los resultados a largo plazo han mejorado en niños, pero no tanto en adultos en los que aún la tasa de curación es menor al 50%. Afortunadamente el estudio de alteraciones moleculares específicas ha permitido crear terapias dirigidas hacia blancos moleculares mejorando los resultados obtenidos con quimioterapia y trasplante de médula ósea.

1. INTRODUCCIÓN

Las leucemias agudas constituyen hemopatías clonales caracterizadas por proliferación de precursores hematopoyéticos tempranos mieloides y/o linfoides, con acumulación de las células neoplásicas (blastos) en la médula ósea superando los elementos normales y con la potencialidad de invadir otros tejidos. Dejadas a su evolución natural tienen un curso fatal en días o semanas.

El primer caso de leucemia aguda fue descrito por Friedrich en 1857, pero el término de leucemia aguda se comenzó a utilizar en 1889 gracias a Ebstein. Desde entonces se produjo la distinción entre las formas agudas y crónicas, planteándose su origen en la médula ósea. El rol de alteraciones cromosómicas en el desarrollo del cáncer fue descrito en 1914, pero el desarrollo técnico en la década de 1950 permitió su análisis más detallado, que introdujo el bandeo cromosómico permitiendo reconocer translocaciones, deleciones e inversiones de cromosomas. Luego del proyecto del genoma humano se pudo comprender en forma más precisa la patología molecular de subtipos de leucemias, mejorar métodos diagnósticos y pronósticos, y finalmente identificar blancos moleculares.

2. LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

2.1. Introducción

La Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) es una enfermedad que afecta primariamente a niños, siendo el 75% de los casos menores de 6 años. La LLA constituye aproximadamente el 75% de las leucemias en menores de 15 años y 35-40% de todas las neoplasias. En adultos constituye un 20% de las leucemias.

Se estima que su incidencia ajustada por edad a nivel mundial es de 1 a 4,75 casos por 100.000 habitantes (Figura 16-1). El 80-85% son de fenotipo B (LLA-B), la que es discretamente más frecuente en varones que mujeres (ratio hombre/mujer de 1,4) y 3 veces más frecuente en raza blanca que negra.

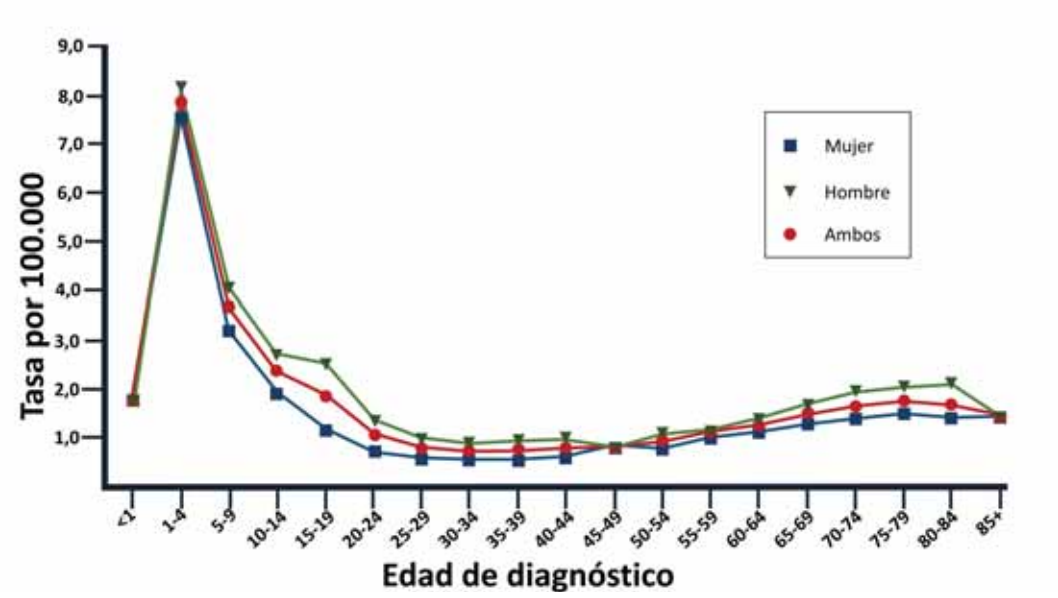


Figura 16-1 Incidencia de LLA según edad y sexo registro SEER*(2014-2018).
(*Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Program National Cancer Institute, USA. Acute Myeloid Leukemia (AML), Incidence rates by age at diagnosis, 2014-2018, and sex, all races).

2.2. Patogenia

Su causa es aún desconocida. La LLA constituye una enfermedad adquirida en la que el inicio y progresión estaría impulsado por mutaciones sucesivas que alteran la función celular, con un aumento de la capacidad de autorenovación, pérdida del control normal de proliferación, bloqueo de la diferenciación y resistencia a señales de muerte celular (apoptosis). Se postula una patogenia multifactorial, describiéndose factores causales exógenos y endógenos. En los primeros se han vinculado exposición a radiaciones y agentes químicos mutagénicos, como pesticidas y solventes, siendo la única que ha demostrado tener un aumento de riesgo de LLA la radiación ionizante. Existe una mayor incidencia

en niños con síndrome de Down y otros trastornos constitucionales menos frecuentes, los cuales representan menos del 5% del total. La LLA familiar es rara, aunque ha sido descrita asociada a mutaciones de PAX5, ETV6 y TP53. Sin embargo, en la mayoría de los casos no es posible reconocer factores etiológicos.

2.3. Cuadro clínico

2.3.1. Aspectos generales

El cuadro clínico típico incluye fatiga, disnea, palidez, dolor óseo y anorexia que se desarrollan en forma aguda, de pocos días, o más insidiosa, de algunas semanas. Por definición la LLA es de localización medular y habitualmente existe presencia de blastos en sangre, cuya magnitud determina la presentación clínica. El compromiso extramedular es común existiendo predilección por sistema nervioso central (SNC), ganglios, bazo, hígado y testículos. El compromiso extramedular determina manifestaciones clínicas más específicas.

2.3.2. Falla medular

La acumulación de blastos en la médula ósea determina un síndrome de falla medular con anemia, trombocitopenia y neutropenia. La anemia se presenta con síntomas como fatigabilidad, palpitaciones y cefalea, progresando, según la intensidad, a disnea, irritabilidad, somnolencia y lipotimias. Al examen físico se objetiva la palidez en mucosas conjuntival o lingual, pliegues palmares y rojo labial.

La trombocitopenia se manifiesta con aparición de petequias, aparición de equimosis espontáneas o ante traumas mínimos, y sangramiento mucoso, principalmente epistaxis, y en mujeres, menometrorragia. Los sangramientos de SNC son raros, pero pueden aparecer cuando existe hiperleucocitosis asociada.

La neutropenia se manifiesta por aparición de síndrome febril, siendo la causa más frecuente infecciones bacterianas, como faringitis o cuadros gastrointestinales, que no responden a esquema antibiótico habitual. Ocasionalmente pueden presentarse con sepsis con riesgo vital.

2.3.3. Síntomas constitucionales e infiltrativos

La LLA como toda neoplasia determina manifestaciones sistémicas denominadas constitucionales como sudoración nocturna, pérdida de peso no intencionada y fiebre de causa no infecciosa. La fiebre paraneoplásica habitualmente se resuelve antes de 72 hrs de iniciada la terapia específica.

La infiltración blástica presente en sangre se disemina a otros órganos como ganglios, bazo e hígado, determinando crecimiento de estos. Las adenopatías palpables son habitualmente pequeñas e indoloras, salvo infección asociada. La esplenomegalia y/o hepatomegalia, presente en aproximadamente el 50% de los casos, puede determinar sensación de plenitud post-prandial o sensación de bulto abdominal.

Otra forma de presentación es con masa mediastínica anterior (presente en 8-10% niños y 15% adultos), la cual puede comprimir grandes vasos y tráquea y llegar a producir un síndrome de vena cava superior y/o síndrome de distress respiratorio. Inicialmente comienzan con tos, disnea, ortopnea, estridor, edema facial y extremidades superiores y en ocasiones síncope. La masa mediastínica es más frecuente en casos de LLA-T pudiendo presentarse en un poco más de la mitad de los casos.

En ocasiones los blastos pueden producir infiltración cutánea, cuya lesión se denomina leucemides o leucemia cutis, pero son infrecuentes al diagnóstico. Las lesiones pueden ser máculo-papulas rosado pálidas a violáceas, y en ocasiones más solevantadas.

2.3.4. Compromiso osteoarticular

El dolor óseo y artralgias pueden ser un síntoma prominente, lo que se encuentra en 25-30% de los niños, siendo menos frecuente en adultos. El dolor se localiza generalmente en extremidades, determinando claudicación y cede parcialmente con analgésicos. El dolor puede obedecer a infiltración leucémica del periostio, hueso o articulación, o expansión de la cavidad medular por los blastos.

2.3.5. Compromiso SNC y otros sitios santuarios

El compromiso de SNC ocurre en menos del 10% de los casos al diagnóstico. Sin embargo, en aquellos protocolos que no incorporan profilaxis quimioterápica de SNC ocurre en 35-75% de los casos dentro del primer año. Se puede manifestar por parálisis de pares craneanos, cefalea, vómitos, signos focales, papiledema o también puede ser asintomático y ser un hallazgo al realizar estudio citológico o por citometría de flujo de líquido cefalorraquídeo. El compromiso habitualmente se restringe a leptomeninges siendo poco comunes las masas parenquimatosas y el compromiso de médula espinal.

Al diagnóstico se debe prestar especial atención al examen genital en varones, ya que en el 10% de los niños puede haber crecimiento testicular asintomático, lo cual en adultos es menos frecuente. Otros sitios extramedulares son amígdalas, adenoides, mama y tracto gastrointestinal. Cualquier compromiso extramedular al diagnóstico es un signo de mal pronóstico.

2.3.6. Hiperleucocitosis

La hiperleucocitosis se refiere a una anormalidad de laboratorio que se ha definido en forma variable como un recuento leucocitario mayor a 50.000 o 100.000/uL, que se asocia a un mayor riesgo de compromiso de SNC, síndrome de lisis tumoral y leucostasis. La leucostasis o hiperleucocitosis sintomática es una emergencia médica consecuencia de la hipoperfusión tisular debida a hiperviscosidad, leucooclusión e invasión vascular en vasos pequeños, lo cual se

asocia a una alta mortalidad dentro de la semana si no se trata rápidamente. La leucostasis se manifiesta por disnea, dolor torácico, confusión y/o priapismo. Esta condición aumenta el riesgo de sangramientos, incluido en SNC. Es más frecuente de observar en leucemia mieloide aguda que en LLA.

2.3.7. Complicaciones Metabólicas

Cuando existe una neoplasia de rápido crecimiento se puede producir el síndrome de lisis tumoral (SLT) antes y después de iniciar la terapia específica. Esta emergencia oncológica se produce por una destrucción masiva de células tumorales y la consecuente liberación de grandes cantidades de potasio, fosfato y ácidos nucleicos a la circulación. El catabolismo de los ácidos nucleicos produce una elevación de ácido úrico, con precipitación en túbulos renales, vasoconstricción, caída flujo sanguíneo renal y posterior aparición de falla renal. Además la hiperfosfatemia produce hipocalcemia asociada. Las manifestaciones clínicas son inespecíficas, e incluyen náuseas, vómitos, diarrea, anorexia y calambres, Luego se puede agregar letargia y convulsiones, arritmias, síncope, insuficiencia cardiaca e incluso muerte súbita.

2.4. Laboratorio

La evaluación inicial de un paciente con sospecha de LLA debe incluir una exhaustiva anamnesis y examen físico, junto a exámenes de sangre e imágenes (Tabla 16-1).

Tabla 16-1 Evaluación de un paciente con LLA

Aproximación Inicial
• Historia clínica completa • Examen físico • Hemograma completo • Perfil bioquímico completo (incluyendo pruebas hepáticas, LDH y uricemia) • Estudios de coagulación • Estudio de LCR • Rx de tórax o tomografía computada de torax
Estudios de Especialidad
• Punción aspirativa de médula ósea: mielograma, citometría de flujo, citogenética y biología molecular • Estudio de histocompatibilidad en caso de ser candidato a trasplante de progenitores hematopoyéticos

2.4.1 Aproximación inicial

Dentro de los exámenes el hemograma es sin duda el examen más relevante, ya que permite objetivar la falla medular y evaluar la morfología de los leuco-

citos, confirmando o no la presencia de blastos en sangre, lo que siempre es patológico. En más del 90% de los casos se ve disminución de al menos una serie. La anemia y trombocitopenia son comunes. La mitad de los casos tiene Hb baja 10 g/dL, carácter normocítico normocrómico hiporregenerativo, y 60-70% tiene plaquetas bajo 100.000 /uL al diagnóstico. Los leucocitos se pueden encontrar bajos, normales o altos, siendo común la neutropenia. La leucocitosis sobre 30.000 solo ocurre en un tercio de los casos. Cuando aparecen blastos en sangre se observa el denominado hiatus leucémico, utilizado para describir la detención de la maduración de los leucocitos en el estadio de blastos sin presencia de células en estadios intermedios. A veces se puede observar síndrome leucoeritroblástico (presencia de desviación extrema a izquierda de fórmula de neutrófilos asociado a eritroblastos en sangre). La eosinofilia es rara, pero se ha descrito asociada a t(5;14).

En el perfil bioquímico es fundamental estudiar si existe un SLT que se caracteriza por: hiperuricemia, hiperfosfatemia, hiperkalemia, alza de creatininemia e hipocalcemia. La nefropatía por cristales raramente da síntomas de vías urinarias y el sedimento de orina puede ser normal. Su diagnóstico de laboratorio se hace con el alza de 2 o más de estos parámetros.

Además, en los pacientes con LLA en más de la mitad de los pacientes se observa elevación de LDH entre 300-1000 U/L.

El estudio de coagulación debe incluir al menos tiempo de protrombina, de tromboplastina parcial activado y fibrinogenemia, ya que en ocasiones se puede observar coagulopatía de consumo y menos frecuentemente falla hepática.

Se debe realizar una punción lumbar (PL) al diagnóstico para determinar si existe compromiso de SNC mediante estudio citoquímico, citológico y de citometría de flujo. En el caso de alto riesgo hemorrágico o de contaminación de LCR por presencia de blastos en sangre la punción debe ser realizada por un operador experimentado, o ser eventualmente diferida hasta lograr disminución de blastos en sangre. Se recomienda administrar quimioterapia intratecal al momento de la PL diagnóstica.

Los estudios imagenológicos, radiografía de tórax y/o tomografía computada, permiten objetivar la presencia de masa mediastínica y también de linfoadenopatías. La mayoría de los pacientes con masa mediastínica la presentan en mediastino anterior, siendo algunas veces voluminosa y asociada a derrame pleural. También pueden llegar a producir síndrome de vena cava superior, obstrucción traqueal y/o derrame pericárdico.

2.4.2 Estudios de especialidad

Para confirmar el diagnóstico es indispensable realizar un estudio medular que incluya análisis morfológico (mielograma), de inmunofenotipo (citometría de flujo), citogenética (cariograma) y estudio molecular. En general no se realiza

biopsia de médula ósea, salvo variantes hipocelulares o aplásicas que son muy infrecuentes.

En el mielograma se observa celularidad medular aumentada o normal constituida por más de un 20% de blastos. Los linfoblastos son pequeños o medianos en tamaño, con un núcleo usualmente redondo, de cromatina laxa, con nucleolo apenas esbozado y alta relación núcleo/citoplasma (N/C) (Figura 16-2). La hematopoyesis residual habitualmente está representada por escasos megacariocitos y eritroblastos.

El estudio de histocompatibilidad se realiza cuando se sospecha que el paciente será candidato a trasplante de médula ósea en su tratamiento. Se debe tomar al inicio dado que se requieren recuentos leucocitarios adecuados y que no haya recibido transfusiones recientes. Además, se recomienda buscar tempranamente a los candidatos a donantes relacionados para estudiarlos también, dado que dicha labor consume tiempo que será muy importante para el paciente cuando tenga la respuesta óptima a la quimioterapia.

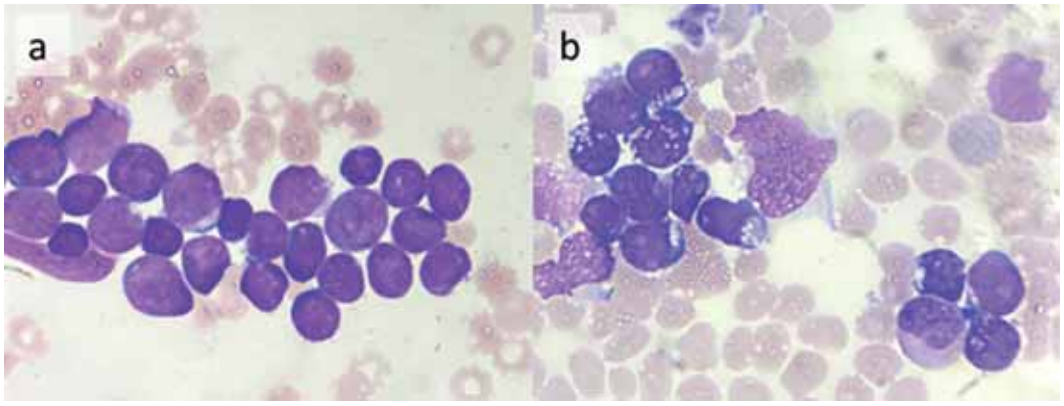


Figura 16-2. Linfoblastos. a) Microscopía óptica 100X de médula ósea con linfoblastos pequeños, nucléolo apenas esbozado en algunos y citoplasma muy escaso (LLA tipo L1 FAB) y b) linfoblastos de otro caso con presencia de 2 nucléolos en la mayoría, citoplasma más abundante y en este caso también vacuolas citoplasmáticas (LLA tipo L2 FAB). (Gentileza de Gerardo Alarcón y Cesar Mera, Unidad Hematología, UACh).

2.5. Clasificación

2.5.1. Según morfología

Existen variaciones en la morfología de las LLA por lo que clásicamente se distinguían según la Clasificación Franco-Americana-Británica (FAB) en:

- LLA-L1: Blastos pequeños uniformes, escasos nucléolos, alta relación N/C.
- LLA-L2: Blastos grandes o de tamaño variado, 1 o más nucléolos, más citoplasma.
- LLA-L3: Blastos grandes vacuolados, nucléolos prominentes.

Sin embargo, esta clasificación ha demostrado ser poco reproducible y carece de valor pronóstico por lo que la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) la ha reemplazado. La que antiguamente se consideraba L3 era el equivalente a leucemia/linfoma de Burkitt, que en realidad es una neoplasia B madura. Además, en ocasiones se pueden observar blastos más pequeños y de cromatina más condensada, por lo que la diferenciación de neoplasias B maduras descansará en el inmunofenotipo.

Las tinciones citoquímicas como la tinción de mieloperoxidasa, PAS (Periodic Acid Schiff), estearasas y fosfatasa ácida eran utilizadas para separar los linajes linfoide y mieloide de las leucemias agudas, pero estas han sido dejadas de lado por el estudio de inmunofenotipo por citometría de flujo. Actualmente solo la tinción de mieloperoxidasa, enzima presente en gránulos primarios de precursores mieloides, se mantiene como criterio para definir una leucemia aguda como de linaje mieloide en la clasificación de la OMS.

2.5.2. Según inmunofenotipo

La LLA-B representa el 75-80% y la LLA-T el 15-25% de las LLA según grandes estudios cooperativos en Europa y Estados Unidos. Los linfoblastos T no se pueden diferenciar por morfología de los B y en ocasiones tampoco de algunos subtipos de LMA, por lo que es necesario realizar un estudio de inmunofenotipo por citometría de flujo. Esta técnica permite determinar la expresión de 6 a 10 antígenos en forma simultánea en los blastos, lo cual permite determinar su etapa de diferenciación. Los marcadores de inmunofenotipo se pueden clasificar en aquellos indicadores de inmadurez, de linaje B y de linaje T. Los marcadores de inmadurez como CD34, TdT y/o CD45 débil o ausente, deben estar presentes para catalogarla como aguda. Los marcadores de linaje B (CD19, CD20, CD22 o CD79a) o de linaje T (CD2, CD3, CD5, CD7 o CD8) permiten determinar su estirpe. Otros marcadores permiten determinar la etapa de diferenciación dentro de cada linaje (Tabla 16-2 y 16-3). Existe un subgrupo de LLA-T denominada LLA de precursores T tempranos (Early T-cell precursor ALL) que expresa uno o más marcadores de células troncales (CD34 y HLA-DR) o de precursores mieloides (CD117, CD33, CD13 o CD11b), no expresa de CD1a ni CD8 y pueden ser CD5 débil o ausente. Lo importante de este subtipo es no confundirla con leucemia aguda de linaje ambiguo (ver Tabla 16-10).

Tabla 16- 2 Subtipos de LLA-B según Inmunofenotipo

Estado de maduración	Inmunofenotipo
Pro-B (B-I)	CD10 neg
B Común (B-II)	CD10 + y cadenas μ citoplasmáticas neg
Pre-B	Cadenas μ citoplasmáticas +

Todas las LLA de precursores B son CD19+ y/o CD79a+ y/o CD22+.

Tabla 16- 3 Subtipos de LLA-T según Inmunofenotipo

Estado de maduración	Inmunofenotipo
Precursor T temprano	CD3 citoplasmático + CD1a y CD8 neg / CD5 débil o neg Expresión marcadores células troncales o mieloides
Pro-T (T-I)	CD7+
Pre-T (T-II)	CD2+ y/o CD5+ y/o CD8+
T Cortical (T-III)	CD1a+
T Madura (T-IV)	CD3 superficie + y CD1a neg

Todas las LLA de precursores T son positivas para CD3 citoplasmático o de membrana. neg=negativo

2.5.3 Según citogenética y biología molecular

Se pueden detectar anormalidades cromosómicas en cerca del 80% de la LLA-B y 70% de las LLA-T. La citogenética y estudio molecular son el segundo factor pronóstico más importante en LLA tanto en niños como adultos. Es frecuente encontrar que las anomalías numéricas y/o cambios estructurales se asocian a alteraciones en la producción de factores de transcripción involucrados en la multiplicación y diferenciación de los precursores hematopoyéticos, los que finalmente determinan su respuesta a tratamiento. Adicionalmente existen alteraciones citogenéticas que son específicas de un determinado fenotipo y susceptible de "target therapy" o terapia blanco.

La hiperdiplodía definida como la presencia de más de 50 cromosomas, se observa en 25% de los niños y 4-5 % de los adultos con LLA, la cual se asocia a pronóstico favorable. La hipodiploidía, menos de 46 cromosomas, se asocia a peor pronóstico cuando existen menos de 39 cromosomas. Se considera seudodiploide cuando existen 46 cromosomas y algunos presentan cambios estructurales. La tabla 16-4 resume las alteraciones citogenéticas más frecuentes en LLA-B, su correlación clínica, de fenotipo y frecuencia.

La t(9;22) (q34;q11.2), frecuente en adultos y rara en niños, resulta en la fusión BCR-ABL1 que tiene un pronóstico ominoso si no se incorpora la terapia blanco con inhibidores de tirosinkinasa (ITK). La t(12;21)(p13;q22) (*ETV6-RUNX1*), a la inversa es común en niños y rara en adultos, se asocia a pronóstico favorable.

Uno de los descubrimientos con mayor relevancia clínica ha sido la descripción de un perfil genético de alto riesgo similar al de LLA Ph+, pero sin el gen de fusión BCR-ABL, que se denomina "Ph-like". Esta categoría incluye rearreglos de: CRLF2(50%), JAK2/EPOR y clase ABL1 (ABL1, ABL2 , CSF1R y PDGRB). Este grupo constituye cerca del 10% de los niños y 27% de los adultos con LLA Ph-, siendo es sensible al uso de ITK. Además en la LLA-T, se ha demostrado que

tienen valor pronóstico las mutaciones de *NOTCH1, FBXW7, RAS* y *PTEN*, siendo favorable la presencia de *NOTCH1* o *FBXW7* en ausencia de RAS/PTEN.

Como se puede observar existen diferencias en la distribución de alteraciones citogenéticas y moleculares según la edad del paciente, lo que en parte explica la diferencia en pronóstico.

Tabla 16-4. Características de las LLA-B con anomalías citogenéticas recurrentes según Clasificación de la OMS (2008).

Alteración Citogenética y/o molecular	Fenotipo	Presentación Clínica	Frecuencia
t(9;22)(q34;q11.2) BCR-ABL1	CD19 +, CD10 +, CD25+; frecuente expresión de antígenos mieloides	Más frecuente en adultos, mal pronóstico. Resultados han mejorado con ITK.	3% LLA niño 19-30% LLA adulto, mayor incidencia con edad
t(v;11q23) MLL-AF4	CD19 +, CD10 – ; expresión aberrante de Ag de neutrófilos CD15	Frecuente presentación con recuento leucocitario alto y compromiso SNC	2-4% LLA niño 3-7% LLA adulto
t(12;21)(p13;q22) ETV6-RUNX1	CD19 +, CD10 +; expresión aberrante de Ag mieloide CD13	Enfermedad con pronóstico favorable con terapia standard	20-25% LLA niño 0-3% LLA adulto
Hiperdiploidía (cromosomas >50 y <66)	CD19 +, CD10 +	Enfermedad con pronóstico favorable con terapia standard	23-29% LLA niño 6-7% LLA adulto
Hipodiploidia (cromosomas <46)	CD19 +, CD10 +	Pobre pronóstico	1% LLA niño 2% LLA adulto
t(5;14)(q31;q32)	CD19 +, CD10 +	Eosinofilia reactiva por sobreexpresión IL-3. Puede haber <20% blastos en MO y a veces indetectable en SP	Rara en adultos
t(1;19)(q23;p13.3)	CD19 + , CD10 + , μ citoplasmático +	No significant association with response to therapy on current protocols	5% LLA niño 2-3% LLA adulto

ITK=inhibidores tirosin kinasa; MLL= gen “mixed-lineage leukemia”; MO=médula ósea; SP=sangre periférica.

2.6. Factores pronósticos

El pronóstico de la LLA ha mejorado a través de las últimas décadas, lo que es más evidente en niños. En el Hospital St. Jude de EEUU la supervivencia global a 5 años de la LLA en niños era en la década de 1960 de 9%, de 1970 48%, subiendo en forma progresiva hasta década del 2000 a 92%. En análisis del Registro Epidemiológicos de EE.UU SEER de 1980 a 2017 la supervivencia global ha mejorado para todos los grupos etarios, incluso mayores de 70 años, como se puede observar en la Tabla 16-5. Esta mejoría se explica por la incorporación del uso de ITK, anticuerpos anti CD20 y la creación de anticuerpos biespecíficos, conjugados de anticuerpos/drogas y la aparición de células T con receptor antigénico quimérico (CAR-T= chimeric antigen receptor T cells) dirigidos contra CD22 y CD19.

Tabla 16-5 Supervivencia Global según SEER* de LLA a 5 años por edad y año de diagnóstico 1980-2017.

		Supervivencia estimada a 5 años %				
Edad(años)	**n**	**Todos**	**1980-1989**	**1990-1999**	**2000-2019**	**2010-2017**
0-14	7247	85	73	85	91	93
15-19	857	61	46	55	71	74
20-29	912	44	33	44	44	59
30-39	736	40	24	30	48	59
40-59	1423	28	14	21	29	43
60-69	723	19	10	14	22	29
>70	890	6	3	4	7	13

* "Surveillance, Epidemiology and End Results Program of National Cancer Institute", EEUU. https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/ajh.26156

Varias características antiguamente identificadas como factores pronósticos en LLA han perdido su valor predictivo en la medida que la terapia ha evolucionado y hecho más intensiva, en especial en adultos. Sin embargo, la edad, el recuento de leucocitos al diagnóstico e inmunofenotipo mantienen su fuerte correlación con sobrevida libre de enfermedad y sobrevida global en pacientes con LLA-Ph-.

En niños el mejor grupo pronóstico son aquellos pacientes con 2 a 10 años debido a la mayor incidencia el cariotipo hiperdiploide y del gen de fusión TEL-AML1 resultante de la t(12;21) críptica. En adultos, aquellos entre 35-60 años se consideran de riesgo standard, y aquellos menores de 30 tienen mejores resultados. Los mayores de 60 años tienen peor pronóstico debido en parte al aumento de características citogenéticas y moleculares negativas, y en particular el cromosoma Ph, lo cual se asocia a menor tasa de remisión completa inicial y menor supervivencia libre de enfermedad y global. Además, las comorbilidades asociadas en personas mayores hacen que la quimioterapia sea peor tolerada.

El recuento leucocitario elevado > 30.000-50.000 en LLA-B y > 100.000 en LLA-T se asocian a menor duración de la remisión. Dentro de las las LLA-B el inmunofenotipo pro-B y dentro de las LLA-T el precursor temprano T (early-T) se consideran grupos de alto riesgo. Además, existen otras características del inmunofenotipo como la asociación de CD20 en LLA-B que ha sido reconocido como un factor de mal pronóstico independiente. La coexpresión de antígenos mieloides que ocurre en 20-30% de las LLA, en especial CD13 y CD33, se ha asociado en algunos estudios a peor pronóstico, pero no ha sido completamente reproducible.

En niños la desaparición rápida de blastos a la semana de inducción ha demostrado ser un importante predictor de sobrevida. En adultos el lograr la remisión en 2 a 4 semanas se asocia a mejor sobrevida, a diferencia de aquellos que la logran posterior a las 4 semanas que se asocia a peor resultado.

La evaluación más detallada de la respuesta al tratamiento por técnicas de enfermedad mínima residual (EMR) mediante citometría de flujo y/o biología molecular han pasado a ser una rutina para el manejo de pacientes con LLA constituyendo un nuevo grupo de alto riesgo aquel con EMR detectable. Los grupos de riesgo más relevantes en adultos y niños se pueden observar en Tabla 16-6.

Tabla 16-6 Factores Pronósticos para Estratificación de Riesgo

Factor Pronóstico	**Favorable**	**Adverso**
Adultos		
Edad (años)	<35	>60
Recuento leucocitario (uL)	<30.000 en LLA-B	>100.000 en LLA-T
Inmunofenotipo	LLA-T tímica	LLA Precursor temprano T
Genotipo	Alta Hiperdiploidía	BCR-ABL1 Rearreglo MLL Hipodiploidía < 44
EMR luego de inducción	Baja o ausente	Alta
Niños		
Edad (años)	1-9	<1 o >10
Recuento leucocitario (uL)	< 50.000	>50.000
Inmunofenotipo	LLA-B	LLA-T
Genotipo	Hiperdiploidía >50 ETV6-RUNX1	Hipodiploidía < 44 MLL-AF4 Deleción/mutación IKZF1
EMR luego de inducción	< 0,01%	>1%

2.7. Diagnóstico diferencial

Cuando existe la sospecha clínica y morfológica al hemograma de una leucemia aguda el diagnóstico se establece en forma inequívoca con la morfología al mielograma acompañado del inmunofenotipo. Lo anterior permite diferenciar la LLA B o T de otras leucemias agudas como LMA o leucemias de linaje ambiguo.

En caso de que la clínica sea menos categórica y/o no se observen blastos en sangre se deben considerar en el diagnóstico diferencial a varias enfermedades neoplásicas y no neoplásicas. Dentro de las patologías no neoplásicas se encuentran algunas infecciones que cursan con linfocitosis como: HIV, síndrome mononucleósico, Bordetella pertussis, arañazo de gato, etc. El síndrome mononucleósico, que cursa con linfoadenopatía generalizada, esplenomegalia, rash cutáneo y fiebre, debe diferenciarse mediante estudio serológico específico y diferenciación morfológica de los linfocitos que son más grandes que los normales, con citoplasma basófilo, tienen un núcleo más irregular y rara vez tienen nucléolo. En caso de sospecha de estas patologías infecciosas y que el estudio específico y la morfología no aclare la etiología, el estudio por inmunofenotipo demostrará el carácter policlonal T de la linfocitosis.

En niños pequeños sin linfocitosis se debe tener especial cuidado con la morfología de los linfocitos, ya que linfocitos normales pueden ser confundidos con linfoblastos.

Por dolores óseos y poliartralgias se debe considerar a enfermedades autoinmunes en el diagnóstico diferencial, en particular la artritis reumatoidea juvenil en que generalmente existen artralgias, en ocasiones artritis, que se pueden asociar a fiebre, palidez, esplenomegalia.

Dentro de las patologías neoplásicas se incluyen: linfoma de Burkitt, leucemia linfática crónica (LLC), linfoma de células del manto, etc. El linfoma de Burkitt, que morfológicamente puede semejar linfoblastos (L3 FAB), corresponde a una neoplasia linfoide B madura por lo que el diagnóstico se establece por su inmunofenotipo y la presencia de marcadores específicos: translocación 8q24 y/o reordenamiento de gen MYC. La LLC se caracteriza por una clínica más insidiosa e inespecífica, siendo en ocasiones la linfocitosis un hallazgo en un control de salud. Dichos linfocitos son habitualmente pequeños y de cromatina condensada, propia de un linfocito maduro.

En caso de tumor mediastínico se debe plantear diagnóstico diferencial con linfomas, timoma y neoplasias de origen germinal en cuyo caso solo la biopsia, idealmente percutánea, permitirá precisarlo.

En caso de bicitopenia o pancitopenia se debe considerar en el diagnóstico diferencial la anemia aplásica y en adultos también los síndromes mielodisplásicos, lo cual se logra en forma definitiva con el estudio medular con biopsia de médula ósea y análisis citogenético.

2.8. Tratamiento de LLA

2.8.1. Terapia de soporte

Si bien la quimioterapia combinada es la base del tratamiento de pacientes con LLA, el manejo óptimo requiere una terapia de soporte muy detallada que incluya prevención y tratamiento de complicaciones metabólicas e infecciosas, uso racional de productos sanguíneos, control del dolor, náuseas y/o vómitos, apoyo psicológico al paciente y su familia, e indicación de accesos venosos centrales.

Dentro de las complicaciones metabólicas la más grave y prevenible es el SLT producido por la destrucción masiva de células tumorales y consecuente liberación de grandes cantidades de potasio, fosfato y ácidos nucleicos a la circulación. Existe un marcado compromiso de la función renal, ya que el aumento súbito de ácido úrico a excretar produce precipitación en túbulos renales, vasoconstricción, alteración de la autoregulación y caída flujo sanguíneo renal. Además, la hiperfosfatemia produce precipitación de cristales de fosfato de calcio tubular y su coexistencia con cristales de ácido úrico favorecen su precipitación entre sí. La presencia de SLT durante el inicio del tratamiento aumenta el riesgo de muerte del paciente, por lo que es de suma importancia su prevención y en caso de estar instalado iniciar su tratamiento. Este es simple y consiste en hidratación intravenosa con soluciones electrolíticas asociado a uso de agentes hipouricemiantes. La hidratación se realiza habitualmente con solución fisiológica al 0,9% , 2-3 L/mt2/día, para lograr diuresis de 80-100 ml/hr/mt2. No usar diuréticos en caso de deshidratación u obstrucción de vías urinarias. Descartado lo anterior, y en presencia de hiperkalemia se recomienda furosemida, pues aumenta la secreción de potasio a nivel tubular. La hidratación se mantiene hasta descartar la aparición del SLT o su inactividad después que lo hubo. No se ha demostrado beneficio de la alcalinización urinaria teniendo una hidratación generosa, reservándose solo para casos con acidosis metabólica. En presencia de hiperuricemia el tratamiento de elección es la rasburicasa. Es discutible el uso de alopurinol, pero si se va a usar se recomienda hacerlo en presencia de hiperuricemia y suspender si desarrolla hiperfosfemia. Se deben asociar quelantes de fosfato como carbonato de calcio oral. En caso de leucostasis se debe realizar leucoaféresis, extracción selectiva de leucocitos, lo cual ayuda a revertir la hipoperfusión tisular y disminuir el riesgo de SLT.

Durante la fase de inducción se puede producir hiperglicemia secundaria al uso de dosis altas de corticoides lo cual requiere monitoreo cercano y en ocasiones terapia con insulina. Esta complicación es más frecuente en aquellos pacientes con antecedentes familiares de diabetes mellitus o en portadores de síndrome de Down.

Junto a la quimioterapia, que es altamente inmunosupresora, se debe asociar profilaxis antiinfecciosa. Durante la inducción se debe iniciar profilaxis para Pneumocystis carinii con sulfametoxazol-trimetoprim, manteniéndolo hasta la mantención. Es recomendable durante la inducción y otros períodos de neutro-

penia dejar profilaxis antifúngica y antiviral contra virus varicela-zoster y herpes simple. La profilaxis antibacteriana con quinolonas como levofloxacino, debe adoptarse de acuerdo con los patrones de resistencia locales de la institución. La aparición de neutropenia febril debe considerarse una emergencia médica con rápida instauración de esquemas antibióticos de amplio espectro adaptados a la historia de infecciones previas en el paciente en particular, posterior a la obtención de todos los cultivos necesarios.

Para acortar los periodos de neutropenia se utilizan factores estimulantes de colonias de granulocitos que han demostrado acortan en algunos días la hospitalización y la incidencia de infecciones grado 3 o más en LLA.

Durante el tratamiento se requiere un adecuado apoyo transfusional en el periodo de mielosupresión post-quimioterapia para prevenir y/o tratar manifestaciones hemorragíparas con transfusiones plaquetarias profilácticas y terapéuticas de acuerdo con recomendaciones internacionales. Habitualmente las manifestaciones hemorrágicas se limitan a piel y mucosas nasal o de cavidad oral, pero en ocasiones pueden ocurrir en SNC, pulmón o tracto gastrointestinal. Cuando se agrega coagulopatía intravascular diseminada se debe apoyar con crioprecipitado y/o plasma fresco congelado. El tratamiento de anemia sintomática con concentrados de glóbulos rojos debe esperar hasta que la hiperleucocitosis extrema se haya controlado.

2.8.2. Quimioterapia

La quimioterapia combinada para LLA se diseñó inicialmente en la década de 1960 en niños, la cual se fue consolidando por estudios de grupos cooperativos internacionales. El grupo Berlín-Frankfurt-Münster (BFM) que demostró que una quimioterapia intensiva de inducción, seguida de consolidación y luego intensificación lograba una mejor supervivencia en niños, estrategia que luego fue introducida en adultos. Estos regímenes de quimioterapia utilizan drogas con diferentes mecanismos de acción, que han evolucionado a través de los años, optimizando dosis y oportunidad de administración para lograr mejores resultados de supervivencia libre de enfermedad y disminuir eventos adversos. Ver figura 16-3. Existen otros protocolos de poliquimioterapia con similares resultados en adultos, pero el BFM es el utilizado a nivel público en Chile.

El objetivo de la terapia inicial o de inducción es lograr un rápido descenso de blastos hasta niveles de remisión medular completa (RC), menos de 5% de blastos, y normalización de recuentos neutrófilos y plaquetas en sangre. Las tasas de RC en adultos son de 84-95%. En niños las tasas de RC son superiores alcanzando hasta 97%.

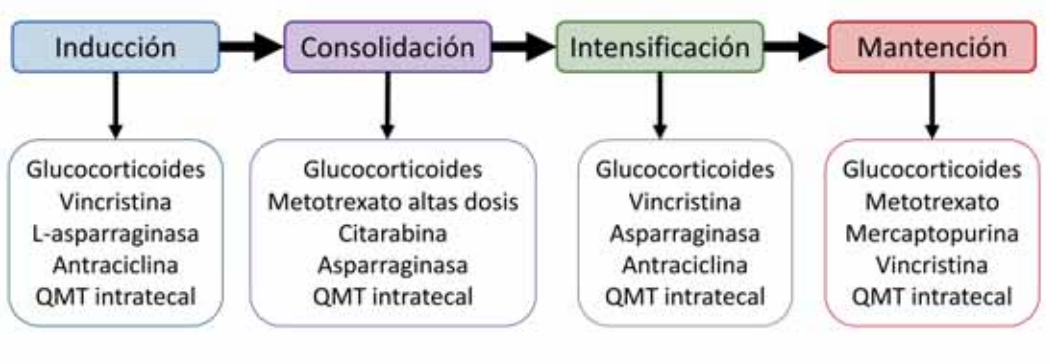


Figura 16-3. Esquema de tratamiento BFM de LLA niños y adultos menores de 60 años.

Dado el riesgo de compromiso de SNC en LLA se agrega profilaxis de SNC con quimioterapia intratecal (QMT IT) o radioterapia de SNC. El diagnóstico de compromiso de SNC clásicamente se realiza por la detección de más de 5 leucocitos por mm^3 en LCR junto a la confirmación de linfoblastos por citología. Con la aparición de técnicas como la citometría de flujo se pueden detectar en forma más sensible. La incorporación de QMT IT profiláctica (sin compromiso SNC) redujo en forma significativa las tasas de recaída de SNC, por lo que actualmente se encuentra incorporada como estándar.

Cuando existe compromiso de SNC el uso combinado de radioterapia SNC y quimioterapia intratecal puede llevar a complicaciones como convulsiones o deterioro de la capacidad cognitiva, lo que además puede retrasar la terapia de consolidación. La asociación de QMT altas dosis (citarabina o metotrexato) y radioterapia SNC también se asocia a toxicidad neurológica inaceptable. La terapia alternativa es la quimioterapia intratecal triple que combina citarabina, metotrexato y corticoides, la que combinada con quimioterapia sistémica de altas dosis logra reducir el riesgo de recaída de SNC en forma significativa.

Cuando el compromiso es sintomático al diagnóstico se realiza habitualmente la QMT IT hasta negativizar el LCR y luego se realiza radioterapia.

En el caso de la LLA-B se demostró que el uso de anticuerpos monoclonales anti-CD20, que se expresa en 30-50%, mejora la sobrevida libre de enfermedad en adultos menores de 60 años.

2.8.3. Trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH)

El TPH, también conocido como trasplante de médula ósea, es una terapia utilizada para restaurar la hematopoyesis luego de administrar quimioterapia y/o radioterapia en altas dosis en los pacientes con leucemias agudas. Su eficacia en LLA se demostró en 1973, y actualmente se encuentra indicado en primera remisión en grupos de alto riesgo o en recaídas posteriores. Los criterios precisos deben ser definidos por los equipos hematológicos en cada centro de

acuerdo a la experiencia y resultados obtenidos por el equipo de trasplante. En niños una minoría requerirá TPH, dado que pocos presentan factores de mal pronóstico. Sin embargo, en adultos, aunque el 80 a 90% logra RC, en menos de la mitad de ellos será duradera y un 10 a 20% tendrá enfermedad resistente, por lo que se estima que 30-60% requerirá TPH.

En LLA el TPH autólogo, cuando el donante es el mismo paciente, no ha demostrado un beneficio debido a la alta tasa de recaídas.

Los resultados del TPH alogénico, donante diferente a paciente, no han sido comparados con la quimioterapia sola mediante estudios genuinamente randomizados, por lo que están sesgados por la disponibilidad de donantes y otros factores. A pesar de ello se sabe que su efecto más potente antileucémico está proporcionado por el mecanismo denominado “injerto versus leucemia”, permitiendo prolongar la sobrevida libre de enfermedad y debe ser balanceado con el efecto injerto versus huésped a largo plazo.

2.8.4. Resultados de tratamiento de LLA

Los resultados dependen de diversos factores pronósticos siendo la edad y alteraciones citogenéticas/moleculares los de mayor relevancia (ver sección 2.6). En la tabla 16-5 se resumen datos de supervivencia global según edad y en la tabla 16-7 se resumen algunos resultados de supervivencia libre de enfermedad según la presencia de determinadas alteraciones genéticas.

El aumento de la intensidad de los tratamientos curativos ha sido posible gracias a la terapia de soporte, permitiendo disminuir la mortalidad en la fase de inducción por infecciones y sangramientos en niños y adultos jóvenes. Sin embargo, en adultos mayores se produce muerte por toxicidad hematológica, hepática y cardíaca con esquemas intensivos, alcanzando cifras de 30%. Por ello, en esta última población se opta por terapias menos intensas y explica los pobres resultados.

El uso de anticuerpos anti-CD22 ha demostrado ser de utilidad en pacientes con enfermedad mínima residual detectable previo al TPH. Además, el uso de anticuerpos biespecíficos "BiTE" (Biespecific T-cell Engager): con especificidad anti CD3 y CD19 mejora los resultados en pacientes con LLA en recaída, tanto con como sin TPH.

En la última década han surgido nuevas terapias celulares como las “CAR-T cells” que consisten en células T a medida para atacar los linfoblastos leucémicos, los cuales han demostrado buena respuesta en pacientes refractarios con LLA-B en que la inmunogenicidad se dirige al antígeno CD19. Hay nuevas especificidades en desarrollo, pero aún se observan efectos adversos significativos.

Tabla 16-7 Supervivencia libre de enfermedad (SLE) en LLA, características clínicas y biológicas de acuerdo a subtipos genéticos.

Subtipo	Características asociadas	SLE (%)	
		Niños	Adultos
Hiperdiploidía (> 50 cromosomas)	Fenotipo precursor B predominante, bajo recuento leucocitario, pronóstico favorable en niños, en especial de 1-9 años	80-90 a 5 años	30-50 a 5 años
Hipodiploidía (<45 cromosomas)	Fenotipo precursor B predominante, recuento leucocitario alto, pobre pronóstico	30-40 a 3 años	10-20 a 3 años
t(12;21)(p13;q22) *ETV6-RUNX1*	CD13+/- CD33+/- fenotipo precursor B, pseudiploidía, pronóstico favorable de 1-9 años	90-95 a 5 años	Se desconoce
t(1;19)(q23;p13.3) *TCF3-PBX1*	CD10+/- CD20- CD34- fenotipo pre-B, pseudodiploidía, recuento leucocitario alto, compromiso SNC, pronóstico depende de terapia	82-90 a 5 años	20-40 a 3 años
t(9;22)(q34;q11.2) *BCR-ABL1*	Fenotipo precursor B predominante, antígenos mieloides, mayor edad, recuento leucocitario alto, mejor pronóstico con terapia con ITK	80-90 a 3 años	≈ 60 a 1 año
t(4;11)(q21;23) con fusión *MLL-AF4*	Fenotipo B maduro, recuento leucocitario alto, pobre pronóstico.	32-40 a 5 años	10-20 a 3 años
Mutaciones *NOTCH1*	Fenotipo T, pronóstico favorable.	90 a 5 años	50 a 4 años
Sobreexpresión de *HOX11*	CD10+ fenotipo T, pronóstico favorable con quimioterapia sola	90 a 5 años	80 a 3 años
Amplificación intracromosómica del cromosoma 21	Fenotipo precursor B, bajo recuento leucocitario, requiere terapia intensificada para contrarrestar pronóstico desfavorable	30 a 5 años	Se desconoce

2.8.5. Complicaciones del tratamiento de la LLA

En la tabla 16-8 se resumen las principales complicaciones agudas y tardías del tratamiento de la LLA. Los pacientes tratados deben ser seguidos para identificar y tratar complicaciones a largo plazo.

Tabla 16-8. Complicaciones del tratamiento de LLA

Medicamento	Complicaciones Agudas	Tardías
Prednisona o dexametasona	Hiperglicemia, hipertensión, alteraciones ánimo, acné, mayor apetito, aumento de peso, ulcera péptica, miopatía.	Necrosis avascular ósea, osteopenia, retardo de crecimiento
Vincristina	Neuropatía periférica, constipación, dolor mandibular, alopecia.	
Daunorrubicina o doxorrubicina	Náuseas y vómitos, mucositis, mielosupresión, hiperpigmentación cutánea	Cardiomiopatía (con dosis acumuladas elevadas)
L-Asparraginasa	Náuseas y vómitos, reacciones alérgicas (rash, broncoespasmo, otros), hiperglicemia, pancreatitis, hepatitis, trombosis venosa cerebral o de EEII	Ninguno
Mercaptopurina	Náuseas y vómitos, mucositis, mielosupresión, dermatitis solar, hepatitis	Osteoporosis (uso prolongado)
Metotrexate	Náuseas y vómitos, hepatitis, mielosupresión, mucositis (con dosis altas), dermatitis solar	Leucoencefalopatía, osteopenia (uso prolongado)
Etopósido o tenipósido	Náuseas y vómitos, alopecia, mucositis, mielosupresión, reacciones alérgicas (broncoespasmo, urticaria, angioedema, hipotensión)	Leucemia mieloide aguda
Citarabina	Náuseas y vómitos, fiebre, rash cutáneo, mucositis, mielosupresión, hepatitis, conjuntivitis/queratitis (con dosis altas)	Disminución de fertilidad

Ciclofosfamida	Náuseas y vómitos, cistitis hemorrágica, SIADH*, alopecia	Cancer de vejiga y leucemia mieloide aguda (con dosis acumuladas elevadas)
Rituximab	Reacciones durante infusión (fiebre, rash, hipotensión, etc), linfopenia	Reactivación hepatitis B
Metotrexate intratecal	Cefalea, fiebre, convulsiones, mielosupresión, mucositis (en pacientes con falla renal)	Encefalopatía o mielopatía (con dosis acumuladas elevadas)
Irradiación cerebro	Alopecia, síndrome de somnolencia post-radioterapia (6-8 semanas posterior)	Convulsiones, microangiopatía, déficit hormona del crecimiento, disfunción tiroidea, osteopenia, cáncer de piel, alopecia

(*SIADH=síndrome de secreción inadecuada de hormona antidiurética)

Las complicaciones a largo plazo en niños tratados por LLA se conocen bien, pero existe menos información detallada en adultos. Existen guías estandarizadas para el seguimiento a largo plazo en niños y adultos jóvenes que también pueden ser aplicadas en adultos se encuentran disponibles en: http://www.survivorshipguidelines.org.

3. LEUCEMIA MIELOBLÁSTICA AGUDA

3.1. Introducción

La leucemia mieloide aguda (LMA) es un cáncer de las células troncales o progenitoras de estirpe mieloide que se caracteriza por la presencia de alteraciones genéticas y epigenéticas recurrentes. La introducción de la citarabina a fines de la década de 1960, seguido de su combinación con daunorrubicina en 1970 permitió comenzar una era de tratamiento efectivo de LMA, combinación que permanece hasta ahora. Luego el TPH permitió introducir una modalidad para curar pacientes elegibles a trasplante.

3.2. Epidemiología

La LMA representa 15-20% de las leucemias agudas en niños y 80% en adultos, siendo su mediana de edad al diagnóstico de 68 años. La tasa de incidencia estandarizada por edad es de 4,3/100.000 habitantes al año, siendo más frecuente en hombres con 5,2/100.000 versus 3,6/100.000 en mujeres. Presenta una variación importante según edad con una incidencia en menores de 1 año

de 1,8/100.000, que disminuye a 0,4/100.000 en niños entre 5 a 9 años, aumenta gradualmente hasta 1,2/100.000 a los 25 años, para luego aumentar exponencialmente hasta 28,5/100.000 en octogenarios (Figura 16-4). Se estima que el 70% de las LMA se diagnostican en mayores de 55 años. La excepción a este aumento con la edad es la leucemia promielocítica aguda cuya incidencia es uniforme a través rangos etarios y es más frecuente en latinos.

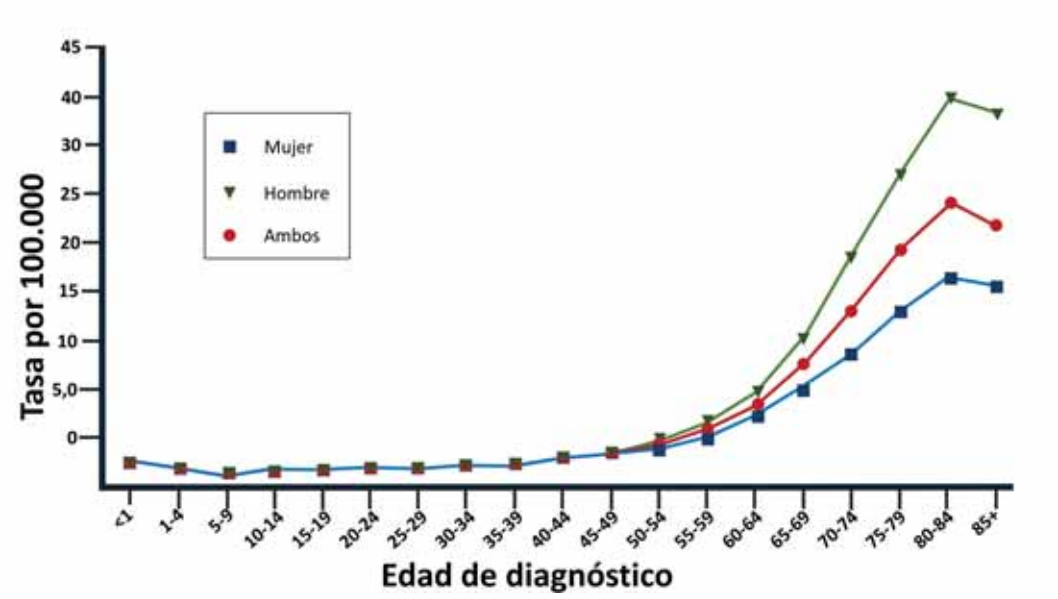


Figura 16-4 Incidencia de LMA según edad y sexo registro SEER*(2014-2018).
(*Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Program National Cancer Institute, USA. Acute Myeloid Leukemia (AML), Incidence rates by age at diagnosis, 2014-2018, and sex, all races).

3.3 Etiología

La causa de la LMA de novo, que surge sin patología hematológica previa, es aún desconocida. La exposición a radiación, exposición crónica a benceno e inhalación de humo de tabaco aumenta su incidencia. Una pequeña proporción de LMA aparece en pacientes tratados por cáncer o con enfermedades autoinmunes, siendo más frecuente en aquellos expuestos a agentes alquilantes o inhibidores de topoisomerasas II. En la mayoría no se observa fuerte influencia de factores hereditarios. En gemelos idénticos con LMA existe mayor riesgo en su hermano, el cual disminuye luego de los primeros años, por lo que estaría relacionado a metástasis intraplacentaria.

Con la evolución del análisis genético, cada vez de mayor resolución, partiendo desde el análisis cromosómico hasta llegar a discriminar pares de bases, junto a una mejor comprensión de los cambios epigenéticos y su interacción con el microambiente medular, se ha avanzado en la comprensión de la biología y comportamiento clínico de la LMA. En las LMA secundarias se ha logrado demostrar

la presencia de clones iniciales adquiridos con el envejecimiento, y con menor frecuencia presentes desde el nacimiento, a los que se le van agregando mutaciones sucesivas, hasta que finalmente se genera un clon con mayor ventaja proliferativa y aparece una LMA que inhibe la hematopoyesis normal.

Tabla 16-9. Grupos funcionales de genes mutados en LMA.

Grupo funcional	Genes Mutados	Rol en leucemogenesis en LMA	Frecuencia
Vías de señalización	FLT3, KIT, JAK2, PTPN11, KRAS, NRAS, NF1, CALR, CSF3R, CBL, SETBP1	Señales de activación confieren ventaja proliferativa.	59-66% (FLT3 33%)
Modificadores epigenéticos	DNMT3A, IDH1, IDH2, TET2,	Metilación del DNA que lleva a desregulación de transcripción	20-44%
	ASXL1, EZH2, KMT2A	Modificación de la cromatina con desregulación de la transcripción	30%
Gen nucleofosmina	NPM1	Proteína transportadora del núcleo al citoplasma que al mutar se localiza en forma aberrante	27-32%
RNA / "spliceosome complex".	SRSF2, U2AF1, SF3B1, ZRSR2	Disminución de función "splicesome" y procesamiento defectuoso de RNA determinando patrones de corte aberrantes	10-13%
Regulación de la transcripción	RUNX1, CEBPA, TP53, WT1, PHF6, GATA2, ETV6, BCOR	Desregulación transcripcional y disminución de la diferenciación hematopoyética	16-23%
"Cohesin complex"	RAD21, STAG1, STAG2, SMC1A, SMC3	Segregación cromosómica defectuosa y alteración en regulación de la transcripción	10-13%

Las alteraciones citogenéticas recurrentes fueron reconocidas en su mayoría antes del 2008, pero con el NGS ("next generation sequencing") se agregaron más

de 50 genes mutados, a través de diferentes grupos de edad, los cuales pueden ser agrupados en diferentes categorías funcionales como: vías de señalización aberrantes, modificadores epigenéticos que participan en metilación del DNA y/o modificación de la cromatina, gen de la nucleofosmina (NPM1), regulación del "spliceosome complex" encargado de alineación de cromátidas, factores de transcripción (en especial mieloides), y "Cohesin complex" que cataliza el plegamiento del genoma en asas de transcripción asociadas. En la Tabla 16-9 se observan los genes mutados que pertenecen a cada grupo y su frecuencia relativa. La mayoría de los casos de LMA tiene mutaciones en más de un grupo funcional, siendo las mutaciones dentro de la misma categoría funcional excluyentes entre sí. Además, existen mutaciones de genes germinales, como GATA2 y CEBPA, que serían predisponentes para las mutaciones previamente mencionadas.

3.4. Cuadro clínico

3.4.1. Compromiso medular

Los síntomas y signos más bien reflejan las consecuencias de las citopenias. Habitualmente los pacientes se presentan con un cuadro de corta evolución de 1-8 semanas de síntomas constitucionales como astenia, fatigabilidad, disnea, palpitaciones o sudoración acompañado de sangramientos de encías, equimosis fácil, epistaxis o menorragia. En general el decaimiento y fatiga son mayores a lo esperado para el grado de anemia. La anorexia y baja de peso son comunes. La fiebre se debe presumir como secundaria a infección, aunque no exista un foco identificable, lo cual debe llevar a un rápido inicio de terapia antibiótica, dejando la fiebre paraneoplásica como un diagnóstico de exclusión. El dolor óseo es menos frecuente y su presencia en un paciente con leucocitosis importante debería hacer sospechar una LLA, en especial en niños y adultos jóvenes. Los hallazgos al examen físico son comunes a cualquier leucemia aguda, con palidez, equimosis o petequias, adenopatías y rara vez hepato o esplenomegalia. No existen signos específicos que permitan distinguir una LMA de una LLA. En algunos casos incluso el examen físico puede ser normal. Con la instauración de neutropenia más severa, lo que ocurre más frecuentemente luego de iniciar la quimioterapia, es habitual la aparición de infecciones bacterianas severas, virales o fúngicas.

La hiperleucocitosis con leucostasis es más frecuente en LMA que en LLA, lo que ocurre en aproximadamente 5%, siendo sus manifestaciones similares (Ver sección 2.3.6.).

3.4.2. Infiltración extramedular

Como los blastos circulan en sangre, estos pueden invadir cualquier tejido extramedular lo que es más frecuente en encías y piel, pero puede ocurrir en cualquier sitio como tracto gastrointestinal, SNC, ganglios u otro. La hipertrofia gingival es más común en LMA con diferenciación monocítica/monoblástica,

pudiendo en ocasiones formar lesiones protuyentes en paladar (Figura 16-5). El compromiso de SNC con parálisis de pares craneanos, trastornos conductuales, confusión o convulsiones son poco frecuentes, a excepción de LMA con hiperleucocitosis (>100.000/uL) o LMA con diferenciación monocítica/monoblástica. La invasión de un tejido extramedular con forma de tumor sólido se denominaba cloroma, pero ahora se designa sarcoma granulocítico o mieloide. Es más frecuente en hueso o piel, y su presencia se asocia a mal pronóstico.

Figura 16-5. Paciente con LMA mielomonoblástica con hipertrofia gingival.

3.4.3. Síndrome hemorragíparo

La aparición de petequias y equimosis en general es proporcional al grado de trombocitopenia, pero en algunos casos de LMA se agrega coagulopatía de consumo por lo que las manifestaciones hemorragíparas pasan a ser más prominentes. Esta complicación es más frecuente en la LMA-M3 o promielocítica que se caracteriza por la presencia de blastos granulares, con frecuentes bastones de Auer, cuyos contenidos desencadenan predominantemente hiperfibrinólisis, acompañado de activación de cascada de coagulación. Esta variante tiene una incidencia que no aumenta con la edad y es mayor en latinos que otras razas. Los sangramientos mucosos como hematemesis, hemoptisis e incluso hemorragia intracerebral son más frecuentes, en presencia de trombocitopenias no tan severas (>30.000). Esta variante tiene excelente pronóstico si se logra superar la etapa hemorragípara.

3.5 Laboratorio

La aproximación a un paciente con sospecha de LMA es similar a la LLA, según lo descrito en Tabla 16-1.

3.5.1. Exámenes generales

El hemograma es la primera herramienta diagnóstica para sospechar una LMA. La anemia es un hallazgo casi constante, con reticulocitosis corregida baja debido a producción insuficiente. Existe en ocasiones aumento del RDW o presencia de eritroblastos.

El recuento leucocitario es menor a 5000 /uL en la mitad de los pacientes. El RAN es menor a 1000/uL en más de la mitad. Los pacientes con leucocitosis, tienen menor proporción de neutrófilos maduros, pero alcanzan RAN normal. En la mayoría de los casos existen blastos en sangre, siendo menos frecuentes en pacientes con leucopenia. Los mieloblastos se pueden observar como células inmaduras agranulares o escasamente granulares (Figura 16-6). La presencia de inclusiones citoplasmásticas de 1-1,5 um de color rojo violáceo son específicos de estirpe mieloide, pues son derivados de los gránulos primarios o azurófilos de los granulocitos. Estas inclusiones se denominan cuerpos de Auer y están presentes en cerca de 15% de los casos, y son más frecuente en la LMA-M3 o promielocítica. Es importante recalcar que los contadores automáticos convencionales no son capaces de diferenciar los blastos, ya que su tamaño y complejidad citoplasmática son similares a monocitos y/o linfocitos, lo que significa que es imprescindible hacer una evaluación morfológica manual al microscopio. La trombocitopenia también es frecuente al diagnóstico, la cual se debe a menor producción y sobrevida, pudiendo observarse macroplaquetas.

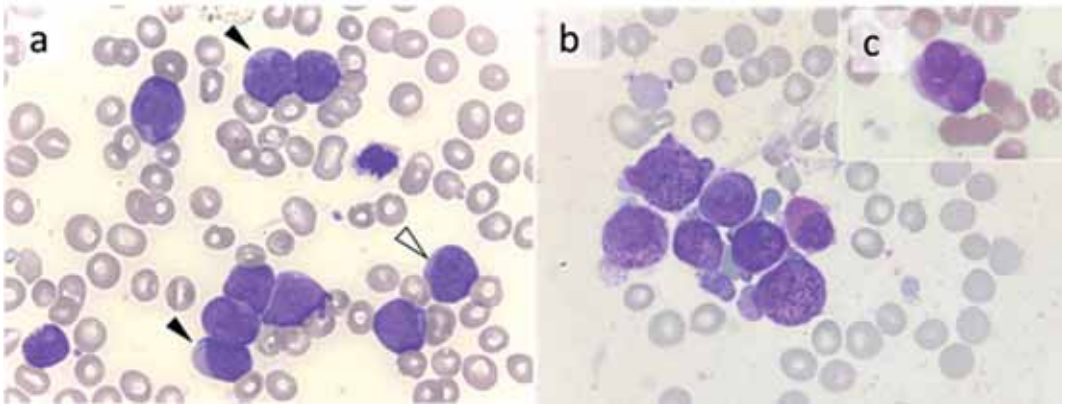


Figura 16-6. Morfología LMA. Microscopía óptica a 100X de: a) Frotis de sangre periférica con mieloblastos, caracterizados por nucléolos prominentes, citoplasma con escasos gránulos (flecha blanca) y bastones de Auer en algunos (flecha negra). b) Mielograma con blastos intensamente granulares, los cuales incluso pueden observarse sobre el núcleo, característico de una leucemia promielocítica aguda, y c) en otro caso de LMA-M3, esta vez variante hipogranular, con núcleo bilobulado característico. (Gentileza de Soledad Rybertt y Gerardo Alarcón, Unidad Hematología, UACh).

3.5.2. Exámenes de especialidad

Para confirmar una LMA es imprescindible el estudio medular, pues de acuerdo a la definición de la OMS se requiere demostrar la presencia de al menos 20% de

blastos de estirpe mieloide. También se considera como LMA aquella con menos de un 20% en presencia de las siguientes anomalías genéticas: t(8,21)(q22;q22.1), inv(16)(p13.1;q22), t(16;16)(p13.1;q22) o t(15;17)(q22;q12) o *PML-RARA.*

Esta definición arbitraria de un 20% deja fuera a algunas leucemias oligoclonales que se presentan inicialmente con blastos entre 10 a 19%, y las cataloga como síndromes mielodisplásicos, aunque su comportamiento clínico y pronóstico depende de los mismos factores pronósticos que las otras.

Para precisar si una leucemia aguda es de estirpe mieloide se requiere demostrar citoquímica positiva para mieloperoxidasa (MPO) o sudan negro en al menos 3%, presencia de bastones de Auer o presencia de marcadores mieloides en los blastos. (ver tabla 16-10).

Se estima que menos del 4% de todas las leucemias agudas no presentan diferenciación para un solo linaje, las cuales reciben el nombre leucemia aguda de linaje ambiguo. Esta categoría incluye las leucemias indiferenciadas y las que expresan antígenos de más de un linaje, siendo lo más habitual coexpresión mieloide con linfoide B o T.

Tabla 16-10. Requerimientos para asignar linaje a una población de blastos según inmunofenotipo.

Linaje	Marcadores
Mieloide	MPO (por citoquímica, citometría o IH*) Diferenciación monocítica (≥ 2 de los siguientes: esterasa no específica, CD11c, CD14, CD64, lisozima)
Linfoide T	CD3 citoplasmático (citometría con anti-cadena épsilon CD3 o CD3 por IH con anti-CD3 cadena zeta (no T específico) CD3 de superficie (raro en leucemia aguda de linaje ambiguo)
Linfoide B	CD19 intenso con fuerte expresión de ≥ 1 de los siguientes: CD79a, CD22 citoplasmático, CD10 o CD19 débil asociado a ≥ 2 de los siguientes: CD79a, CD22 citoplasmático, CD10

*IH= inmunohistoquímica

3.6 Clasificación de las LMA

3.6.1. Según criterios FAB

El primer intento de clasificación fue del grupo franco-americano-británico (FAB) que lo hizo según morfología considerando porcentaje de blastos, grado de diferenciación y linaje involucrado (tabla 16-11). En ese momento se exigía más de un 30% de blastos en médula ósea para considerarla leucemia aguda.

Tabla 16-11. Clasificación FAB de LMA.

Tipo	Características
M0 Mieloide indiferenciada	Blastos con MPO(-) en microscopía óptica, marcadores linfoides ausentes y mieloides presentes
M1 Mieloide sin diferenciación	Blastos ≥ 90% de las CNE en MO ≥ 3% de los blastos MPO (+)
M2 Mieloide con maduración	Blastos ≥ 30% de las CNE en MO Componente monocítico < 20% de las CNE
M3 Promielocítica	Predominio de blastos "promielocíticos"
M4 Mielomonocítica	Blastos ≥ 30% y ≤ 90% de las CNE en MO Componente monocítico ≥ 20% de las CNE o > 5000 celulas monocíticas en SP
M5 Monocítica	Células monocíticas (monoblastos y promonocitos) > 80% de las CNE
M6 Eritroide	Eritroblastos ≥ 50% de las células nucleadas Blastos ≥ 30% de las CNE en MO
M7 Megacarioblástica	Megacarioblastos > 30%

MPO=mieloperoxidasa; CNE=células no eritroides; SP=sangre periférica.

3.6.2. Según criterios OMS

La clasificación de la OMS jerarquiza los criterios genéticos, luego enfermedades predisponentes y finalmente morfología para definir las diferentes entidades (tabla 16-12).

Tabla 16-12. Clasificación de la OMS de Neoplasias Mieloides (2017).

LMA con anomalías genéticas recurrentes	LMA con t(8,21)(q22;q22.1); *RUNX1-RUNX1T1* LMA con inv(16)(p13.1q22) o t(16 ;16)(p13.1 ;q22) ; *CBFB-MYH11* Leucemia Promielocítica Aguda con *PML-RARA* LMA con t(9;11)(p21.3;q23.3); *KMT2A-MLLT3* LMA con t(6,9)(p23;q34.1) *DEK-NUP214* LMA con inv(3)(q21.3;q26.2) o t(3;3)(q21.3 ;q26.2); *GATA2, MECOM* LMA (megacarioblástica) con t(1 ;22)(p13.3; q13.1); *RBM15-MKL1* LMA con *BCR-ABL1* LMA con mutaciones génicas: *NPM1, CEBPA bialélico o RUNX1*
LMA con cambios relacionados a mielodisplasia	
LMA asociada a terapias	Asociada a terapia citotóxica o radiación.
LMA no especificada (NOS*)	LMA con diferenciación mínima LMA sin maduración LMA con maduración Leucemia mielomonocítica aguda Leucemia monoblástica y monocítica aguda Leucemia eritroide pura Leucemia megacarioblástica aguda Leucemia basofílica aguda Panmielosis aguda con mielofibrosis
LMA asociada a Síndrome de Down	

*Not otherwise specified. Nota: La neoplasia de células dendríticas plasmocitoides blásticas se considera una entidad fuera de las relacionadas a precursores mieloides.

Dentro de las alteraciones genéticas merecen especial mención aquellas que provocan cambios en genes del "core binding factor" (CBF), factor de transcripción heterodimérico cuya subunidad alfa (codificada por gen *RUNX1*) se une a la secuencia de DNA de consenso y a la subunidad beta (codificada por gen *CBFG*) aumentando la afinidad por el DNA. La t(8;21) presente en 10% de las LMA, en especial en LMA-M2, produce una proteína de fusión *RUNX1-RUNX1T1* que lleva a interferencia en la diferenciación hematopoyética y activación de genes de TP53. Además, existe alteración del CBF en la inv(16) y t(16;16), que se asocian a LMA-M4 variante eosinofílica, y pueden haber mutaciones del gen del CBF solo detectables a nivel molecular.

La fusión del gen de la leucemia promielocítica aguda (*PML*) y el gen del receptor de ácido transretinoico alfa (*RARA*) está presente en el 95% de las LMA-M3, y en el 5% existen otros genes de fusión alternativos asociados a *PML*. Estas proteínas de fusión llevan a una detención de la proliferación y diferenciación. Este defecto se revierte rápidamente con terapias blanco que se unen al receptor de ácido transretinoico.

Dada la clara asociación de mutaciones en el *CBF* y *PML RARA* y el desarrollo de LMA su presencia es suficiente para el diagnóstico de LMA.

3.7 Factores Pronósticos

Los factores pronósticos de LMA los podemos separar en aquellos dependientes del paciente y de la enfermedad. Los primeros son los que determinan la probabilidad de sobrevivir la inducción siendo los más importantes la edad, estado de desempeño ("performance status") y las funciones renal, cardíaca y hepática. Para evaluar estas características no existe una única herramienta estandarizada, sino múltiples puntajes pronósticos o escalas de comorbilidades, como el índice de Charlson o puntaje de TPH. En pacientes mayores se recomienda utilizar una escala de evaluación geriátrica integral para poder definir si usar intervenciones más agresivas o de menor intensidad.

Los factores pronósticos relacionados con la enfermedad determinan la resistencia a la terapia e incluyen: antecedentes de enfermedades hematológicas previas como síndrome mielodisplásico, exposición a quimio y/o radioterapia y características biológicas de la LMA. Dentro de las características biológicas las alteraciones genéticas (tabla 16-13) y la respuesta a la primera terapia son los más relevantes. La evaluación de la respuesta al tratamiento que consiste en evaluar si logra la remisión completa (RC), definida como <5% blastos al mielograma, mantiene su valor predictivo. Actualmente el estudio de enfermedad mínima residual (EMR), es decir persistencia de enfermedad bajo el umbral de la microscopía óptica, es el factor pronóstico más poderoso de respuesta a tratamiento. La EMR evalúa mejor la calidad de la respuesta y, además, permite detectar más precozmente una eventual recaída. Por lo tanto, es un criterio que se ha incorporado en escalas de riesgo y permite intensificar terapia en pacientes elegibles. El impacto de un factor pronóstico puede cambiar dependiendo de si recibe TPH alogénico o solo terapia citotóxica convencional.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, la mayor incidencia de LMA en personas mayores que presentan mayores comorbilidades y menor respuesta al tratamiento hace que sean el grupo de peor pronóstico.

Tabla 16-13. Estratificación pronóstica de acuerdo a las alteraciones genéticas según European Leukemia Net (ELN).

Categoría de Riesgo	Anormalidad Genética
Favorable	t(8;21)(q22;q22.1); *RUNX1-RUNX1T1* inv(16)(p13.1q22) o t(16 ;16)(p13.1 ;q22) ; *CBFB-MYH11* *NPM1* mutado sin *FLT3-ITD* o con *FLT3-ITD* [bajo] *CEPBPA* mutado bialélico
Intermedia	*NPM1* mutado con *FLT3-ITD* [alto] *NPM1* wild-type sin *FLT3-ITD* o con *FLT3-ITD* [bajo] (sin lesiones genéticas adversas) t(9;11)(p21.3;q23.3); *MLLT3-KMT2A* Anomalías citogenéticas no clasificadas como favorables ni adversas
Adverso	t(6;9)(p23;q34.1); *DEK-NUP214* t(v ;11q23.3); *KMT2A* reordenado t(9;22)(q34.1; q11.2); *BCR-ABL1* inv(3)(q21.3;q26.2) o t(3;3)(q21.3; q26.2); *GATA2, MECOM(EVI1)* -5 o del(5q); -7; -17/abn(17p) Cariotipo complejo*, cariotipo monosómico** *NPM1* wild-type con FLT3-ITD [alto] *RUNX1* mutado *ASLX1* mutado *TP53* mutado

(RUNX=runt related transcription factor; FLT=fms-like tirosyne kinase; CBFG=core binding factor gene; *MYH11*=smooth muscle myosin heavy chain 11; *CEBPA*= CCAAT-enhancer binding protein alpha; *MLL*=Mixed lineage leukemia; KMT2A=Lysine Methyltransferase 2A; *NPM1*= nucleophosmin-1 mutation; *DEK*=Proteína nuclear DEK; *NUP214*=Nucleoporin 214; *BCR*= Breakpoint Cluster Región; *ABL1=Ableson; GATA2*= GATA Binding Protein 2, *MECOM(EV11)*= MDS1 and EVI1 complex locus ; *ASLX1*=ASXL Transcriptional Regulator 1; *TP53*= tumor protein p53).

3.8 Diagnóstico Diferencial

La reacción leucemoide que consiste en el aumento de los leucocitos por encima de 50.000 mm^3 (algunos autores consideran más de 30.000 mm^3), puede confundirse con una leucemia aguda o crónica. Ocurre como una respuesta a muchas enfermedades con liberación masiva de leucocitos inmaduros a sangre periférica. Se observa un incremento exagerado de neutrófilos con desviación extrema a izquierda, apareciendo tanto neutrófilos maduros e inmaduros, inclusive blastos. Además, existen granulaciones tóxicas y vacuolas en los neutrófilos. Se producen en el contexto de una infección aguda o crónica, intoxicaciones, hemorragias o hemólisis severa, cetoacidosis diabética, quemaduras graves o neoplasias (riñón, mama y estómago).

Las patologías que causan pancitopenia sin presencia de blastos en sangre como aplasia, hiperesplenismo u otras se diferencian de la LMA por la ausencia de blastos en médula ósea.

Los síndromes mielodisplásicos se acompañan de anomalías en la maduración de las diferentes series y por definición tienen 19% o menos de blastos en médula ósea.

En niños menores de 6 meses se debe considerar en el diagnóstico diferencial el síndrome mieloproliferativo transitorio o leucemia transitoria neonatal que es una entidad que suele asociarse a pacientes afectados de síndrome de Down. Se resuelve de manera espontánea en 4 o 5 meses, salvo en 25% de los casos en quienes puede desarrollarse posteriormente una leucemia megacarioblástica aguda, o un síndrome mielodisplásico. Rara vez se ha descrito sin anomalías constitucionales.

3.9. Tratamiento

El tratamiento de la LMA es una de las intervenciones oncológicas más desafiantes dadas las múltiples complicaciones relacionadas a la enfermedad y tratamiento, lo cual requiere un enfoque mutidisciplinario que incluya a hematólogos, enfermeras y químicos farmacéuticos especializados, asociado a la disponibilidad de múltiples otros especialistas (infectólogo, nutriólogo, etc). La terapia de soporte, incluyendo la terapia transfusional y control de síntomas han jugado un papel importante en la mejoría de los resultados en las ultimas décadas. El enfoque general del tratamiento se muestra en la figura 16-7.

En personas mayores y/o con comorbilidades importantes, gupo que se denomina "unfit", del inglés estar en mal estado físico, se recomiendan quimioterapias de menor intensidad con asociación de hipometilantes.

3.9.1. Medidas generales

Junto con la quimioterapia es fundamental la hidratación y otras medidas de prevención de síndrome de lisis tumoral, soporte transfusional y manejo enérgico de las infecciones similar a lo descrito para LLA (ver sección 1.8.1.). En caso de leucostasis se inicia quimioterapia con hidroxiurea.

3.9.2. Quimioterapia convencional

Dada la distribución etaria en los pacientes con LMA las decisiones terapéuticas están determinadas principalmente por la edad del paciente (Figura 16-7). Salvo comorbilidades serias en general los menores de 60 años son tratados con una quimioterapia de inducción seguido de consolidación. La decisión de tratar con estos esquemas sobre esa edad dependerá principalmente de factores del paciente como edad, estado de desempeño (PS), y comorbilidades, así como también su contexto social y/o familiar y los deseos del paciente.

La quimioterapia de inducción convencional está dada por la asociación de citarabina en infusión continua por 7 días y antraciclina por 3 días, esquema denominado 7+3. Este esquema logra tasas de RC de 75-80% en menores de 60 años y de 45-60% en mayores de 60 años seleccionados, tasas que se han mantenido estables en las últimas 2 décadas. Si el paciente no logra RC se le repite la quimioterapia de inducción, con lo que un 50% de ellos logra RC.

Luego se continúa con quimioterapia de consolidación con citarabina altas dosis ("high dose cytosine arabinoside" = HiDAC), ya que sin esta fase la recaída es segura. Las LMA con mutaciones del CBF, presente en 15-20% de las LMA, son altamente sensibles a la citarabina logrando tasas de RC de 80–90%. Se recomienda usar como consolidación 3-4 ciclos de HiDAC de 3g/m^2 por 3 días, lo que logra una supervivencia global a 5 años de 60%, sin necesidad de TPH alogénico en primera RC. En las LMA con mutación de CBF y mutaciones de *KIT* asociadas se obtienen peores resultados, por lo que deben buscarse en forma dirigida al diagnóstico.

En los pacientes con otros tipos de LMA de riesgo favorable por genética (Tabla 16-12) se recomienda consolidación con 3-4 ciclos de HiDAC 1,5-2,0 g/m^2 por 3 días. Los pacientes con LMA de riesgo intermedio o adverso genético tienen indicación de TPH alogénico en primera RC, siendo el beneficio más evidente para aquellos con riesgo adverso. En la última década se han incorporado nuevas drogas que serán abordadas en sección 3.9.4.

El compromiso de SNC ocurre en menos del 5% por lo que no se realiza profilaxis de SNC como en la LLA. Con el uso de HiDAC las recaídas a este nivel prácticamente han desaparecido.

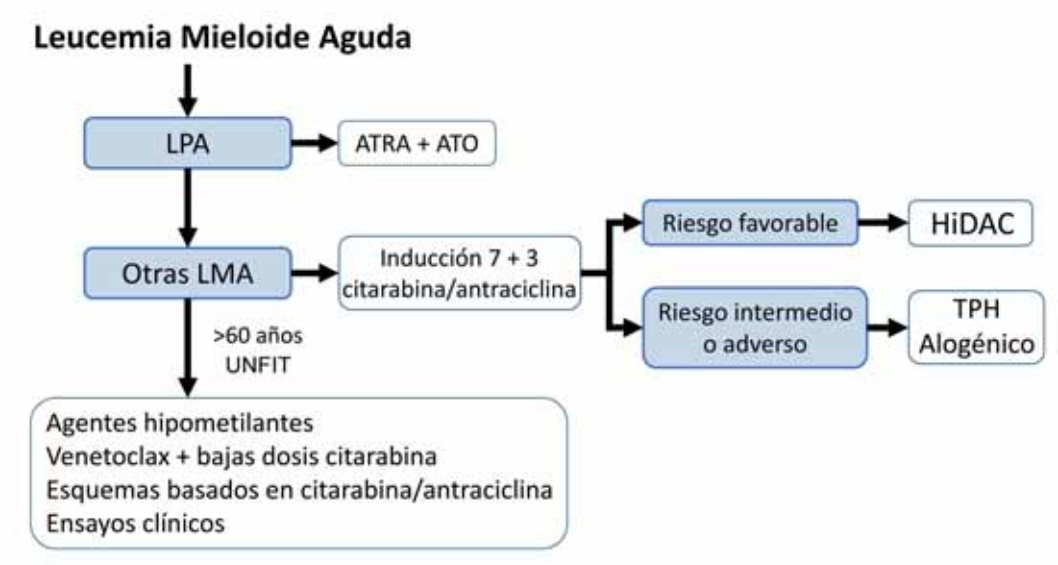


Figura 16-7. Aproximación al tratamiento de LMA. (LPA=Leucemia promielocítica aguda; ATRA=ácido transretinoico; ATO=trióxido de arsénico; UNFIT= no apto para quimioterapia intensiva; HiDAC=High dose citosine arabinoside).

3.9.3. Tratamiento Leucemia Promielocítica Aguda

La leucemia promielocítica aguda (LPA) caracterizada por la presencia de la t(15;17) en el 95% de los casos, que resulta en un gen de fusión *PML-RARA* que genera una detención súbita de la proliferación y diferenciación de los precursores granulocíticos. La administración de ácido transretinoico (ATRA) y trióxido de arsénico (ATO) resulta en la activación de la diferenciación de estos blastos, lo cual ha generado una dramática mejoría de supervivencia de estos pacientes. La tasa de RC con la asociación ATRA-ATO es de 100% y supervivencia a largo plazo 85-90%. Además, el ATRA tiene un efecto rápido sobre la coagulopatía disminuyendo los eventos hemorrágicos, por lo cual debe instaurarse ante la sospecha de LPA sin esperar la confirmación. En un 10-25% se puede presentar como efecto adverso un "síndrome de diferenciación" o "síndrome ATRA", caracterizado por retención hídrica, fiebre, infiltrados pulmonares, pudiendo llegar a un distress respiratorio agudo no cardiogénico. Su tratamiento es con corticoides y eventual suspensión transitoria del ATRA y/o ATO.

3.9.4 Trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH)

El TPH alogénico actualmente se acepta como la mejor estrategia para reducir el riesgo de recaída en los grupos de riesgo intermedio y adverso, logrando mejor sobrevida libre de enfermedad, pero no mejor sobrevida global, ya que la mortalidad asociada al procedimiento es aún importante y muchos de los pacientes que recaen pueden ser rescatados con TPH alogénico en ese momento. Para que los pacientes de alto riesgo se beneficien del TPH este debe llevarse a cabo tan pronto como se logra la RC, para evitar la recaída antes de realizarlo y disminuir sus complicaciones. Se debe tener en cuenta además los otros factores de riesgo asociados a la genética al definir la indicación de TPH.

Luego de una recaída de una LMA, en una segunda RC, el TPH alogénico logra mejorar la supervivencia de 20% a 40%. Los mejores predictores de éxito son la edad, duración de la primera RC y grupo de riesgo genético.

3.9.5. Nuevas terapias

En la última década la comprensión de los mecanismos celulares y el conocimiento de la heterogeneidad genómica en LMA ha resultado en avances acelerados en la terapia de la LMA. Por lo anterior, la aparición de nuevos blancos terapéuticos hace necesario una caracterización genómica detallada de la LMA al diagnóstico y recaída.

En aquellas LMA con expresión *FLT3*, se ha visto un beneficio en sobrevida global y sobrevida libre de enfermedad, con el uso de inhibidores específicos, como la midostaurina, asociado a 7+3 en la inducción. El uso de Gemtuzumab ozogamicin (GO), una asociación de un anticuerpo anti CD33 y un citotóxico, mejora la supervivencia libre de enfermedad en pacientes de riesgo genético favorable e intermedio con expresión de CD33.

Considerando que el 70% de las LMA se diagnostica en mayores de 55 años y 60% en mayores de 65 años, la mayoría de los pacientes no reúne las condiciones para recibir terapias de alta intensidad o "unfit", recomendándose en ellos el uso de agentes hipometilantes o del inhibidor de BCL-2 Venetoclax asociado a citarabina dosis bajas es seguro y efectivo. También el uso de daunorrubicina lipoencapsulada con citarabina es superior a esquema 7+3 convencional.

Recientemente se ha demostrado que el uso de inhibidores de la vía de hedgehog, Glasdegib, mejora la sobrevida en pacientes unfit comparado con citarabina bajas dosis sola. La presencia de mutaciones de *IDH* (isocitrato deshidrogenasa) puede ser utilizada como blanco terapéutico en pacientes con mutación de *IDH1* e *IDH2* utilizando ivosidenib o enasidenib, respectivamente.

La elección de las nuevas terapias debe considerar siempre no solo la prolongación de la sobrevida, sino priorizar calidad de vida, sin dejar de considerar lo que se conoce como toxicidad financiera, dado sus altísimos costos.

4. LECTURAS SUGERIDAS

1. Kaushansky K, Lichtman MA, Prchal J, Levi MM, Press OW, Burns LJ, Caligiuri MA. **Williams Hematology**, 9th Ed, McGraw Hill Professional, EEUU: 2015.

2. Hoffman R, Benz E, Silberstein LE, Heslop HE, Weitz JI, Anastasi J, Salama M, Abutalib S. **Hematology: Basic Principles and Practice**. 8th Ed. Elsevier: 2017.

3. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J. **WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. 4th Ed. International Agency for Research in Cancer, Lyon: 2017.

4. **Guías Prácticas Clínicas Medicina Transfusional: Indicación de Transfusión**. Sociedad Chilena de Hematología SOCHIHEM 2017.
https://www.sochihem.cl/bases/arch1588.pdf

Capítulo

17

SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS

Patricio Rojas R. e Iván Palomo G.

Resumen

1. Introducción

2. Clasificación de los SMD

3. Patogénesis de los síndromes mielodisplásicos

4. Diagnóstico
- 4.1. Alteraciones morfológicas
  - 4.1.1. Alteraciones citológicas generales
  - 4.1.2. Alteraciones morfológicas en los diferentes tipos de SMD
- 4.2. Alteraciones citogenéticas
- 4.3. Alteración molecular

5. Evaluación diagnóstica de mielodisplasia

6. Tratamiento de los SMD

7. Lecturas sugeridas

RESUMEN

Los síndromes Mielodisplásicos (SMD) son un grupo heterogéneo de desórdenes clonales adquiridos de células hematopoyéticas de estirpe mieloide inmaduras, caracterizado por hematopoyesis inefectiva ocasionando citopenias en grado variable, morfología anormal (displasia) de las diferentes series, y riesgo variable de transformación a leucemia mieloide aguda (LMA).

Su fisiopatología se caracteriza por un proceso de varios pasos, que involucran cambios citogenéticos y/o mutaciones, alteraciones en el microambiente de la médula ósea e hipermetilación generalizada de genes en etapas avanzadas.

Los SMD se clasifican según la cantidad de líneas mieloides comprometidas (granulocítica, eritroblástica, megacariocítica), si poseen sideroblastos en anillo o no, la cantidad de blastos, y las alteraciones citogenéticas que presentan.

Este capítulo trata sobre las características de laboratorio, tanto de sangre periférica como de médula ósea, citogenética, y biología molecular de los diferentes tipos de SMD y algunos aspectos de su patogenia y tratamiento.

1. INTRODUCCIÓN

Los SMD son probablemente el grupo de enfermedades hematológicas clonales de mayor frecuencia. Este hecho y su tendencia a evolucionar a Leucemia mieloide aguda (LMA), ha convertido a este grupo heterogéneo de enfermedades en foco de numerosos estudios, cuyos principales objetivos han sido clarificar su etiopatogenia, desarrollar clasificaciones con valor pronóstico y biológico, y además evaluar distintas modalidades de tratamiento.

Se estima que la incidencia de los SMD es de 4-12/100.000 habitantes por año, pudiendo llegar a 30/100.000 habitantes por año en los individuos mayores de 70 años. La aparición en la edad pediátrica y en el adulto joven es rara, y hace necesario descartar otras etiologías (ej: Anemia de Fanconi, Diskeratosis Congénita, etc) y con poca frecuencia se han descrito algunos casos de SMD familiar.

2. CLASIFICACIÓN DE LOS SMD

En la clasificación actual de la OMS los SMD con <5% de blastos son separados en aquellos con displasia en linaje único y multilinaje. En el grupo de SMD con displasia de linaje único, los pacientes con sideroblastos en anillo (SMD-SA) tienen una menor tasa de progresión a LMA, y en general, poseen una prolongada supervivencia (SG), en especial si la mutación SF3B1 está presente de manera

solitaria o al menos no asociado con mutaciones de mal pronóstico como mutación RUNX1. La entidad de SMD con deleción del brazo largo del cromosoma 5 (del (5q)) no es definido por criterios morfológicos sino solo por la presencia de "del (5q)", por lo que se hace obligatorio el análisis citogenético. Finalmente, la leucemia mielomonocítica crónica en la nueva clasificación de la OMS se ha movido a neoplasias mielodisplásicas / mieloproliferativas (tabla 17-1).

Tabla 17-1. Clasificación de la OMS de los SMD (2016)

Descripción	Líneas displásicas	Citopenias	SA (%) entre los eritroblastos	Blastos (%) en MO/SP	Citogenética
SMD con displasia unilínea (SMD-DUL)	1	1 o 2	<15%	<5/<1, no bastones de Auer	Cualquiera
SMD con displasia multilínea (SMD-DML)	2-3	1-3	<15%	<5/<1, no bastones de Auer	Cualquiera
SMD con sideroblastos en anillo (SMD-SA)					
SMD-SA-DUL	1	1 o 2	≥15%	<5/<1, no bastones de Auer	Cualquiera
SMD-SA-DML	2-3	1-3	≥15%	<5/<1, no bastones de Auer	Cualquiera
SMD con deleción 5q aislada	1-3	1-2	Ausencia o aislados	<5/<1, no bastones de Auer	Del(5q) aislada o con una adicional
SMD con exceso de blastos (SMD-EB)					
SMD-EB-1	0-3	1-3	Ausencia o aislados	5-9/2-4, no bastones de Auer	Cualquiera
SMD-EB-2	0-3	1-3		10-19/5-19 o bastones de Auer	Cualquiera
SMD inclasificable (SMD-I)					
Con 1% de blastos en SP	1-3	1-3	Ausencia o aislados	<5/=1, no bastones de Auer	Cualquiera
Con DUL + pancitopenia	1	3	Ausencia o aislados	<5/<1, no bastones de Auer	Cualquiera
Con alteraciones citogenéticas	0	1-3	<15%	<5/<1, no bastones de Auer	Anomalías específicas de SMD

SMD, Síndrome Mielodisplástico; SA, Sideroblastos en anillo; MO, Médula ósea; SP, Sangre periférica

3. PATOGÉNESIS DE LOS SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS

La mielodisplasia está considerada como un grupo de desórdenes clonales caracterizados por hematopoyesis inefectiva y susceptibilidad a leucemia aguda en un plazo variable, sin embargo, hay condiciones premalignas que podrían antecederla, y no son tan infrecuentes, por lo que deben ser conocidas y monitorizadas (tabla 17-2).

Existen situaciones donde no se cumplen los criterios mínimos para el diagnóstico de SMD pese a que exista citopenia y cierto grado de displasia. Se recomienda un seguimiento, al menos, cada 6 meses.

ICUS (citopenia idiopática de significado incierto): individuos con citopenias sanguíneas únicas o múltiples que permanecen inexplicables a pesar de una adecuada evaluación (incluido el estudio de la médula ósea) y no tienen una alteración genética clonal. Pacientes con ICUS pueden tener citopenias debido a condición reactiva no diagnosticada, otras condiciones no neoplásicas, o una neoplasia no mieloide.

CHIP (hematopoyesis clonal de potencial indeterminado): individuos en que se sabe que tienen una mutación clonal asociada con neoplasia hematológica pero aún no cumplen los criterios diagnósticos para una neoplasia hematológica en específico, y no tienen una citopenia clínicamente significativa. El riesgo de CHIP aumenta con la edad y ocurre en > 10% de personas mayores de 70 años con recuentos sanguíneos normales, y además en pacientes con exposición previa a quimioterapia o radiación. Las personas con CHIP tienen un mayor riesgo de progresión a una neoplasia maligna hematológica que se estima en 0,5% a 1% por año. CHIP está también asociado con un aumento en todas las causas de mortalidad y un mayor riesgo de eventos cardiovasculares. Esto es actualmente atribuido al concepto de que las células clonales derivadas promueven aún más la inflamación en las placas ateroscleróticas.

CCUS (citopenia clonal de significado incierto): individuos con una mutación clonal y una o más citopenias clínicamente significativas que no cumplen con lo definido por la OMS para diagnóstico de una neoplasia hematológica. El riesgo de progresión de CCUS a SMD es más alto que para ICUS o CHIP.

Tabla 17-2. Hematopoyesis clonal como estado precursor a neoplasias hematológicas

CARACTERÍSTICA	ICUS	CHIP	CCUS	SMD
CLONALIDAD	-	+	+/-	+/-
DISPLASIA EN MO	-	-	-	+
CITOPENIA	+	-	+	+
BLASTOS MO	<5%	<5%	<5%	<5% a <19%
RIESGO	Muy bajo	Muy bajo	Bajo	bajo a alto
TRATAMIENTO	Observación		Obs/Soporte/ Factores de crecimiento	Conforme al riesgo

La proliferación clonal es la consecuencia de una mutación somática adquirida que confiere una ventaja proliferativa a estas células aumentando su capacidad de auto renovación. Esta clonalidad puede ser determinada por análisis citogenético, hibridización fluorescente in situ (FISH) o estudio de Secuenciación de Siguiente Generación (NGS).

Aunque la celularidad medular habitualmente está normal o aumentada en más del 80% de las médulas óseas con mielodisplasia, hay discrepancia con las citopenias periféricas por hematopoyesis ineficaz.

Los genes mutados de forma recurrente incluyen los que involucran Splicing de RNA, metilación de DNA, modificación de histonas, regulación de la transcripción, control de reparación del DNA, señalización intracelular y en replicación celular.

Los genes más frecuentemente mutados son SF3B1, TET2, SRSF2, ASXL1, DNMT3A y RUNX1. Los reguladores epigenéticos TET2 y DNMT3A son los con estado mutado de mayor frecuencia, encontrándose no solo en SMD sino también en CHIP y CCUS.

En la deleción de 5q, ocurre haploinsuficiencia de múltiples genes. En particular, la producción de haploinsuficiencia de caseína quinasa 1A1, codificada por CSNK1A1, lo que explica tanto la expansión clonal de células madre mutantes y la eficacia de la lenalidomida para suprimir
esta proliferación.

La mutación SF3B1 identifica un subtipo distinto de SMD que se caracteriza por sideroblastos en anillo, eritropoyesis ineficaz y anemia macrocítica, en general otorga buen pronóstico.

Los genes de spliceosoma SRSF2 y U2AF1 en estado mutado son recurrentes en varias neoplasias mieloides, que generalmente se caracterizan por un mal pronóstico clínico. Mutación del gen TP53 o la pérdida de este ya sea por deleción del brazo corto del cromosoma 17, del(17p), o de todo el cromosoma 17, del(17), se asocian a muy mal pronóstico con reducida expectativa de vida.

4. DIAGNÓSTICO

Las manifestaciones clínicas en los pacientes afectados de SMD generalmente son consecuencia del grado de citopenia existente. Los síntomas más frecuentes incluyen fatiga, fiebre y sangrados. En un 20% de los casos puede encontrarse esplenomegalia, muchas veces relacionada con el diagnóstico de LMMC (Leucemia Mielomonocítica Crónica).

4.1. Alteraciones morfológicas

4.1.1. Alteraciones citológicas

Un elemento fundamental en el diagnóstico son las alteraciones morfológicas cualitativas en una o más series hematopoyéticas que aparecen tanto en sangre periférica como en médula ósea (tabla 17-3) y deben estar presentes, como mínimo, en el 10% de las células de cada una de las series.

Tabla 17-3. Alteraciones morfológicas observadas en los SMD

	Sangre periférica	Médula ósea
Diseritropoyesis	Anemia Macrocitosis moderada Normocromía Poiquilocitosis Punteado basófilo Células rojas nucleadas	Cambios megaloblásticos Multinuclearidad Fragmentación nuclear Alteraciones citoplasmáticas Sideroblastos en anillo Aumento de eritroblastos
Disgranulopoyesis	Neutropenia Pseudo Pelger-Huet Hipo o hipergranulación Distribución irregular de la cromatina nuclear	Hiperplasia Hipogranulación Granulaciones mixtas Aumento de la basofilia citoplasmática Anomalías nucleares Presencia de blastos con o sin alteraciones nucleares
Dismegacaripoyesis	Trombocitopenia Plaquetas alargadas Hipogranulación Hipergranulación	Micromegacariocitos Megacariocitos con pequeños núcleos múltiples redondeados Núcleos bilobulados Hipogranulación Reducción del número de megacariocitos

a) Sangre periférica

Aparecen una o más citopenias, siendo la anemia la más frecuente, se observa en alrededor del 85% de los casos, acompañada de macrocitosis moderada, además puede encontrarse doble población de glóbulos rojos.

Es frecuente encontrar eliptocitos, esquistocitos, punteado basófilo y eritroblastos. Estas alteraciones reflejan la eritropoyesis anormal que resulta de un desbalance entre la proliferación y diferenciación eritroide, y la apoptosis.

Las alteraciones granulomonocitarias en el momento del diagnóstico están presente en alrededor del 50% de los pacientes. Es frecuente encontrar neutropenia acompañada de hipolobulación (Pseudo-Pelger) y de hipogranulación, con el consiguiente defecto funcional de estas células. La leucocitosis con incremento absoluto de monocitos (>1x10^9/L) hace necesario descartar la existencia de LMMC.

La trombocitopenia está presente en el 30% de los casos al momento del diagnóstico. Las plaquetas son gigantes, anormalmente alargadas e hipogranulares. Raramente puede observarse trombocitosis, la que se asocia con del(5q).

b) Médula ósea

La médula ósea generalmente se presenta hipercelular, pero hay un pequeño porcentaje de pacientes que puede presentar médula ósea hipocelular (SMD hipoplásico).

La serie eritroide generalmente se encuentra hiperplásica, con alteraciones estructurales citoplasmáticas, entre las que destacan la presencia de vacuolas y la basofilia intensa, alteraciones nucleares e incremento del número de eritroblastos hasta en un 50%. En esta diseritropoyesis suele observarse glóbulos rojos macrocíticos, que pueden ir acompañados de glóbulos rojos normo y microcíticos.

Los eritroblastos presentan displasia, tanto en el núcleo como en el citoplasma, y pueden ser PAS+.

La serie granulocítica usualmente está aumentada y muestra las alteraciones morfológicas descritas en sangre periférica. Adicionalmente se observan granulaciones mixtas y la persistencia de basofilia citoplasmática. Las características y porcentaje de blastos son factores determinantes en la clasificación y confiere uno de los valores pronóstico más importante.

La serie megacariocítica frecuentemente está aumentada a expensas de micromegacariocitos. La dismegacariopoyesis está presente en casi la mitad de los pacientes en el momento del diagnóstico, se encuentran alteraciones de tamaño, alteraciones nucleares y citoplasmáticas.

4.2. Alteraciones citogenéticas

Las alteraciones del cariotipo están presentes en el 30-50% de los SMD.

La investigación de la citogenética en la médula ósea, complementada con FISH y/o NGS es esencial en la evaluación de una mielodisplasia.

Las alteraciones complejas, denominadas así porque incluyen más de tres alteraciones cromosómicas ocurren en el 15% de los SMD primarios y 50% en los SMD secundarios, se asocia a mal pronóstico clínico. Son más frecuentes las alteraciones de los cromosomas 5 y 7.

La tabla 17-4, muestra las alteraciones descritas en los SMD.

Tabla 17-4. Alteraciones citogenéticas más frecuentes en los SMD

Alteración	Localización
Deleción parcial de un cromosoma	5q, 20q, 7q, 11q, 12q, 13q
Pérdida de un cromosoma	Monosomía 7 y 17, pérdida del Y
Ganancia de un cromosoma	Trisomía 8, 11, 21
Translocaciones	t(3; 3) (q21; q26) t(1; 7) (p11; p11) t(5; 17) (p11; p11) t(7; 17) (p11; p11) t(5; 7) (q11; p11)
Alteraciones complejas	Involucran a más de dos cromosomas
Otras	iso (17q)
	inv (3) (q21; q26)

La aplicación sistemática de estudios citogenéticos en los SMD es de suma importancia, ya que aporta información complementaria a la citología y permite el establecimiento de entidades citológica-citogenéticas. El estudio con FISH nos permite observar alteraciones que no son detectadas por citogenética convencional. La información obtenida por citogenética convencional (cariotipo oncológico), FISH y NGS nos permite estratificar la enfermedad, y permite estimar el riesgo de trasnsformación leucémica y sobrevida.

4.3. Alteración molecular

Los genes más frecuentemente mutados son SF3B1, TET2, SRSF2, ASXL1, DNMT3A y RUNX1, con una frecuencia variable entre 10-30% de los casos de SMD.

La cantidad de mutaciones impacta en sobrevida (Figura 17-1) y el tipo de mutaciones también.

La presencia de mutación en SF3B1 es de buen pronóstico, con media de sobrevida de 7.5 años, DNMT3A, ASXL1, RUNX1, SRSF2, CBL son consideradas de riesgo intermedio con sobrevida de 1.3 años, EZH2 es de mal pronóstico, sobrevda de 0.8 años y TP53 la de peor pronóstico con sobrevida de un poco más de 6 meses.

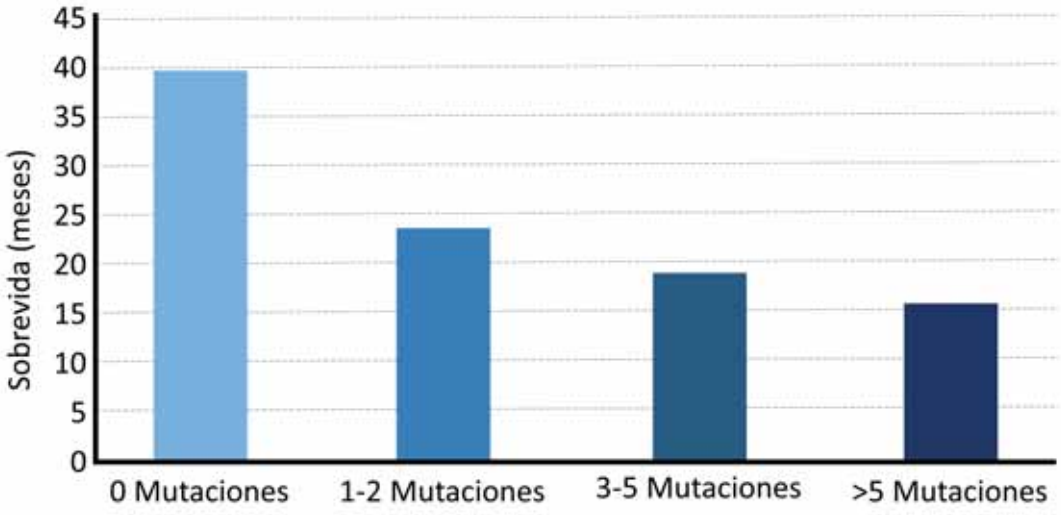


Figura 17-1. Carga del Número de Mutaciones en Sobrevida

5. EVALUACIÓN DIAGNÓSTICA DE MIELODISPLASIA

El diagnóstico de los SMD es de exclusión, por lo que es necesario descartar la existencia de grupo de entidades con características morfológicas similares antes de establecer el diagnóstico final, entre ellos podemos citar: anemia megaloblásticas, leucemias agudas, anemia aplásica, entre otras. Algunos investigadores han propuesto criterios mínimos para el diagnóstico.

Entre estos criterios propuestos destacan: presencia de megacariocitos multinucleados, mieloblastos agranulares o con presencia de bastones de Auer, neutrófilos agranulares, diseritropoyesis, sideroblastos en anillo y alteraciones del cariotipo.

En el diagnóstico se debe incluir: historia clínica detallada, historia familiar de leucemia o alteraciones constitucionales congénitas. Antecedentes de terapia citotóxica o exposición a radiación. Examen físico: búsqueda de desórdenes congénitos (anemia de Fanconi, enfermedad de Shwachman, Neurofibromatosis, síndrome de Down, enfermedad de Kostmann, Noonan. Laboratorio: Hemograma, reticulocitos, volumen corpuscular, plaquetas, VHS; pruebas de coagulación, estudio de función hepática y renal, LDH. Cuantificación de Inmunoglobulinas, Vitamina B12, serología para virus de Epstein-Barr, Citomegalovirus, Parvovirus,

Herpes 6, Micoplasma, VIH. Médula ósea: aspirado para morfología y tinción de fierro (hemosiderina), inmunofenotipo por citometría de flujo (evaluar maduración, aberrancia y blastos), citogenética convecional (cariotipo), idealmente FISH o NGS, y biopsia medular.

El índice pronóstico internacional revisado (IPSS-R) utiliza para determinar el "score", el porcentaje de blastos en médula ósea, el cariotipo y la citogenética (tabla 17-5), permitiendo dirigir la toxicidad de la terapia en relación al riesgo de la enfermedad, con manejo desde observación hasta trasplante alogénico de médula ósea.

Tabla 17-5. Índice de pronóstico internacional revisado (IPSS-R)

Variable	0	0,5	1	1,5	2	3	4
Citogenética	Muy bueno		Bueno		Intermedio	Mala	Muy mala
Blastos (%) en médula ósea	< 2 %		2-5 %		5-10 %	>10 %	
Hemoglobina g/dL	> 10		8-10	<8			
Plaquetas x 10^3/µL.	>100	50-100	<50				
RAN x 10^3/µL.	>800	<800					

Grupo riesgo según IPSS-R	Score	Supervivencia (años)	25% evolución a LMA (años)
Muy bajo	< 1,5	8,8	NA
Bajo 1,5–3	5,3	10,8	
Intermedio	3-4,5	3,0	3,2
Alto 4,5–6	1,6	1,4	
Muy alto> 6	0,8	0,73	

NA : No alcanzado.
Citogenética : Muy bueno: del(11q),-Y.; Bueno: normal, del(20q), del(5q), del(12p).; Intermedio: trisomía 8, del (7q); Mala: inv 3,-7, compleja con 3 anormalidades; Muy mala: compleja (>3 anormalidades).
RAN : Recuento absoluto de neutrófilos

6. TRATAMIENTO DE LOS SMD

Este es un grupo heterogéneo de enfermedades en que la conducta clínica varía y la aproximación terapéutica es a veces controversial. Es de mucha importancia tener bien caracterizado cada paciente para clasificarlo en la forma adecuada. El tratamiento óptimo no ha sido bien definido.

La heterogeneidad clínico biológica de los SMD y la diversidad de tratamientos disponibles con diferente intensidad y toxicidad, reflejan la ausencia de un tratamiento efectivo para la mayoría de los casos. Ello obliga a individualizar el tratamiento de estas enfermedades según la edad, estado general del paciente y la severidad del SMD. En cada caso, un diagnóstico preciso y la determinación del IPSS-R son esenciales para trazar un plan terapéutico.

Tratamiento de soporte

Muchos pacientes con SMD presentan citopenias leves y estables durante largo tiempo. Cuando las citopenias se agravan es necesario realizar transfusiones, ya sea de glóbulos rojos para la anemia y plaquetas para tratar trombocitopenias sintomáticas.

Cuando los requerimientos de transfusiones de glóbulos rojos son elevados, se requiere utilizar conjuntamente quelantes de fierro, con el fin de evitar la sobrecarga tisular.

También se suelen administrar antibióticos profilácticos en pacientes neutropénicos.

Trasplante de progenitores hematopoyéticos

El trasplante de “stem cells” es la única alternativa terapéutica curativa disponible actualmente, pero esta estrategia asume riesgo de mortalidad variable según comorbilidades y edad. Se recomienda trasplantar lo antes posible a todos los pacientes menores de 40 años, y a los mayores de esa edad cuando hay citopenias graves o exceso de blastos. Se plantea en todo paciente menor de 60 con riesgo intermedio o alto, y en casos seleccionados entre 60- 70 años. Existen varias modalidades de trasplante de progenitores hematopoyéticos: TPH alogénico de donante relacionado, el cual puede ser 100% compatible (fullmatch) o semi compatible (haploidéntico). Trasplante de donante no relacionado (idealmente fullmatch o máximo con un miss match), en adultos, la mayoría de los injertos se obtienen de sangre periférica, dado que la recolección de linfocitos T del donante y Células NK, otorgarían protección por efecto injerto vs tumor, las cosechas de médula ósea, otorgan menos riesgo de enfermedad injerto contra huésped, pero también menor efecto injerto contra tumor. Lo más habitual es una preparación con condicionamiento de intensidad reducida, tipo Fludarabina-Melfalan, con células hematopoyéticas recolectadas por vía periférica.

Quimioterapia

Reservada para pacientes de muy alto riesgo, con transformación inminente a Leucemia Aguda, usualmente como puente a trasplante. Uno de los esquemas más efectivos, en especial en alto riesgo, es FLAGIDA (Fludarabina, Citarabina, Idarrubicina), sería menos tóxico y otorga mayor tasas de respuesta completa que esquema 7+3 (citarabina-Daunorrubicina). Está en estudio la adición de Venetoclax a esquema FLAGIDA, esquema FLAVIDA, que podría ser aún mejor en lograr respuestas completas.

Factores de crecimiento hematopoyético

No eliminan los SMD, pero al aumentar los recuentos de las células sanguíneas pueden reducir la cantidad de transfusiones en algunos pacientes.

Lo más utilizado es Eritropoyetina (Epo) recombinante en pacientes con niveles séricos de Epo <500 ng/dL, y que por lo general sean de bajo riesgo.

Los factores estimuladores de colonias de granulocitos (G-CSF) y sus formas pegiladas (Pegfilgrastim o Lipegfilgrastim) se intentan evitar desde riesgo intermedio en adelante, dado riesgo mayor de transformación leucémica, y se han descrito estallido esplénico con las formas pegiladas.

Agonistas de TPO (eltrombopag y romiplostim) aumentan progresión de enfermedad, y se utilizan en casos muy seleccionados.

Terapia inmunosupresora

Se utilizan en pacientes jóvenes con SMD, que presentan una médula ósea hipoplásica (<15% de celularidad), que suelen presentar cariotipo normal y número de blastos normal en médula.

El tratamiento con Globulina Antitimocito (ATG) y Ciclosporina (Cy), ha demostrado una eficacia en estudios que el 34 y 47%, respectivamente, de los pacientes con SMD tratados, los cuales no requirieron más transfusiones, presentaron un decrecimiento de la progresión de la enfermedad y un aumento de la sobrevida. Hoy en día, aunque se observan respuestas significativas, es importante tener presente los efectos secundarios que puede presentar el paciente, como fiebre, urticaria, anafilaxis que raramente se presenta pero es severa, en el caso de ATG y daños renales, hipertensión arterial en el caso de la Cy. Por esta razón, en algunos pacientes se pone en duda su utilidad.

Agentes hipometilantes

La Metilación DNA es un proceso dinámico que afecta tasas de transcripción. Si se “hipermetilan” regiones promotoras de genes ocurre la silenciación de estos. DNMT1 (DNA metiltransferesa 1) es una enzima responsable de mantener patro-

nes de metilación de citidina. Azacitidina y Decitabina son análogos de citosina que inhiben DNMT1, hipometilan DNA y producen reversión del silencio génico.

El uso de Azacitidina como monoterapia reduce el riesgo de transformación a leucemia aguda, mejora la calidad de vida, y prolongaría sobrevida en 7 meses en pacientes de alto riesgo. Decitabina es otro agente hipometilizante con menos claridad en beneficio de sobrevida en monoterapia.

Inmunomoduladores y pro apoptóticos

Lenalidomida tiene características inmunomoduladoras, antiangiogénicas y antineoplásicas a través de múltiples mecanismos. Inhibe selectivamente la secreción de citoquinas proinflamatorias (potente inhibidor de la secreción del factor de necrosis tumoral alfa); mejora la inmunidad mediada por células estimulando la proliferación de células T (lo que da como resultado un aumento de la secreción de IL-2 e interferón gamma); inhibe las señales tróficas de los factores angiogénicos en las células. Se utiliza en Mielodisplasia con del(5q), también se puede usar en pacientes de bajo riesgo con dependencia transfusional sensibilizando respuesta a Eritropoyetina.

Venetoclax es un inhibidor de BCL-2, una proteína anti apoptótica. Su uso en combinación con Hipometilantes ha demostrado prolongar significativamente sobrevida, mediana de 28 meses, y es considerado la combinación muchas veces como primera línea en pacientes de alto riesgo, no candidatos a trasplante hematopoyético alogénico.

7. LECTURAS SUGERIDAS

Aricó, M., Biondi, A., Pui, CH. “Juvenile myelomonocytic leukemia” Blood, 90:479-4884, 1997.

Cazzola, M. “Alternatives to Conventional or Myeloblative chemotherapy in Myelodysplastic Dyndrome”. International Journal of Hematology. 72(2): 134 – 138, 2000.

Cazzola, M. “Myelodysplastic Syndromes”. N Engl J Med; 383:1358-74, 2020.

Cook, MR, Karp, JE, Lai, C. “The spectrum of genetic mutations in myelodysplastic syndrome: Should we update prognostication?” eJHaem. 00 1– 13, 2021.

Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, Santini V, et al; “Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study”. Lancet Oncol.10(3):223-32, 2009.

Fenaux P, Haase D, Santini V, Sanz GF, Platzbecker U, Mey U; ESMO Guidelines Committee. "Myelodysplastic syndromes: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up". Ann Oncol. 32(2):142-156. 2021.

Fernández, N. "Clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de los Síndromes Mielodisplásicos". Hematología (edición especial). 87(6): 18 – 20, 2002.

Kardos, G., Baumann, S., Passmore, J. et al. "Refractory anemia in childhood: a retrospective analysis of 67 patients with particular refrence to monosomy 7". Blood 102: 1997-2003, 2003.

Kovides, P., Bennett, J. "Morphology anda classification of the Myelodysplastic Síndromes and their pathologic variants". Anals of Oncology. 11(4): 275 – 280, 2000.

Luna-Finemann, S., Shannon, K., Atwater, S. et al. "Myelodysplastic and myeloproliferative disorders of childhood: A study of 167 patients". Blood; 93:459-4665, 1999.

Niemeyer, C.M., Aricó, M., Baro, G. et al. "Chronic myelomonocytic leukemia in childhood: A retrospective analysis of 110 cases". Blood, 89: 3534-35433, 1997.

Ortega, J. "Síndromes Mielodisplásicos en niños. Clasificación y Tratamiento". Hematología (edición especial). 87(1): 100 – 108, 2002.

Passmore, S.J., Hann, I.M., Stiller, C.A. et al. "Pediatric myelodysplasia: A study of 68 children and a new prognosis scoring system". Blood; 85: 1742-17502, 1995.

Sanz, G., Sanz, M. "Pronostic factors in Myelodysplastic Syndromes". Journal of Clinical Oncology. 19(9): 2215 – 2217, 2002.

Sanz, G. "Valor del Índice Pronóstico Internacional (IPSS) en los Síndromes Mielodisplásicos". Hematología (edición especial). 87(6): 280 – 284, 2003.

Schanz J, Tüchler H, Solé F, Mallo M, et al. "New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge". J Clin Oncol. 10;30(8):820-9. 2012.

Solé, F. "Asociaciones morfológico citogenéticas en los síndromes mielodisplásicos". Hematología (edición especial). 87(6) 275 – 280, 2003.

Tordecilla, J., Bravo, M., Campbell, M. et al "Síndrome mielodisplásico en pediatría: Experiencia clínica". Rev Chil Pediatr; 70:376-3836, 1999.

SECCIÓN 2.2 **SERIE ROJA**

Capítulo 18. Síndrome Anémico

Capítulo 19. Anemia Ferropriva

Capítulo 20. Anemias Megaloblásticas

Capítulo 21. Anemia Sideroblástica

Capítulo 22. Anemia Secundaria a Enfermedades Crónicas

Capítulo 23. Anemias Hemolíticas Intracorpusculares

Capítulo 24. Anemias Hemolíticas Extracorpusculares

Capítulo

18

ANEMIA Y SÍNDROME ANÉMICO

Pablo Sepúlveda e Iván Palomo G.

Resumen
1. **Introducción**
2. **Definición de Anemia**
3. **Estudio de laboratorio**
   - 3.1. Recuento de GR, Hto y Hb
   - 3.2. Índices eritrocitarios
   - 3.3. Recuento de reticulocitos, índice reticulocitario y fracción de reticulocitos inmaduros (IRF)
4. **Mecanismos de adaptación y sintomatología**
   - 4.1. Mecanismos de adaptación
   - 4.2. Síntomas y signos
5. **Clasificaciones de las anemias**
   - 5.1. Clasificación morfológica
   - 5.2. Clasificación fisiopatológica
     - 5.2.1. Anemias arregenerativas
     - 5.2.2. Anemias regenerativas
6. **Lecturas sugeridas**

RESUMEN

Las anemias se encuentran entre las patologías hematológicas más frecuentes. Este capítulo introductorio sobre anemias, incluye aspectos como: definición de anemia, estudio de laboratorio, mecanismos de adaptación y sintomatología, y clasificaciones de las anemias. Respecto a este último tema, se describe las clasificaciones morfológica y fisiopatológica.

1. INTRODUCCIÓN

Se denomina síndrome anémico al conjunto de síntomas y signos que aparecen con la anemia. La anemia es un síntoma y no una enfermedad definida, por ello al pesquisar una anemia, ya sea por un examen de laboratorio o por la clínica, se debe avanzar en el diagnóstico y determinar la causa, ya que el tratamiento es diferente en cada caso. Los signos y síntomas que acompañan a la anemia son consecuencia de los mecanismos de adaptación del organismo frente al fenómeno de hipoxia, lo que resulta de la falla en la capacidad de aporte de oxígeno a los tejidos. Dichos cambios son más evidentes en los sistemas respiratorio y cardiovascular, y cuyo desarrollo está en relación directa con la severidad y tiempo de evolución del proceso patológico.

La anemia es la causa más frecuente de consulta hematológica, afecta a un 30% de la población mundial de todas las edades y clases sociales, y es cuatro veces más frecuente en la mujer que en el hombre. Las mujeres presentan un "peak" en la edad fértil. Más de la mitad de las anemias son debidas a deficiencia de hierro y alrededor de un tercio a déficit de folato o vitamina B_{12}.

En este capítulo se revisarán básicamente tres aspectos: definición de anemia, estudio de laboratorio, mecanismos de adaptación y sintomatología, y clasificaciones de las anemias.

2. DEFINICIÓN DE ANEMIA

La definición más aceptada de anemia es la propuesta por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la que se basa en la concentración de hemoglobina (Hb), se define como el descenso del nivel de hemoglobina en dos desviaciones estándar por debajo de lo normal para la edad y el sexo. El valor normal de Hb puede variar según la edad, el sexo, y algunas situaciones especiales como la altura de residencia o embarazo. Así, los niños de 6 meses a 2 años con concentración de Hb menor de 10.5 g/dL, y de 6 a 12 años con Hb inferior a 11.5 g/dL, presentan anemia. Para los adultos el criterio es diferente según se trate de hombres o mujeres; el límite inferior normal es de 1.53 y 12 g/dL de Hb, respectivamente. En mujeres embarazadas (a nivel del mar) los valores normales de Hb no deben ser inferiores a 11 g/dL.

Además del criterio básico de la OMS, la definición de anemia puede asimismo incluir los valores de hematocrito (Hto) y el recuento de glóbulos rojos (GR). Así, se considera que un hombre presenta anemia cuando tiene un recuento de GR menor de 4.5 x 10^6/µL, menos de 13 g/dL de Hb y menos de 42% de Hto. Dichos valores en la mujer son de 4 x 10^6/µL, 12 g/dL y 37%, respectivamente. En la tabla 1 se muestran valores normales para Hb en adultos y niños.

Tabla 18-1. Valores normales de hemoglobina

		Hemoglobina (g/dL)
Adultos	Mujeres Varones	12.0-16.0 13.5-17.5
Niños	0-2 semanas	13.5-20.5
	1 mes	10.0 -18.0
	2 meses	9.0-14.0
	3-6 meses	9.5-13.5
	6-24 meses	10.5-13.5
	2-6 años	11.5-13.5
	6-12 años	11.5-15.5
	12- 18 años Mujeres Varones	 12.0-16.0 13.0-16.0

El diagnóstico de anemia requiere establecer una buena historia clínica y el hallazgo de parámetros específicos de laboratorio. El establecimiento de la causa subyacente en cada caso de anemia es esencial para el tratamiento adecuado.

La determinación de Hb es una medida de concentración, por lo que se debe tener en cuenta el estado general del individuo y los análisis deben ser considerados en el contexto clínico del paciente ya que, a veces, los valores tomados aisladamente, aunque normales, pueden indicar anemia, por ejemplo un paciente de sexo masculino que acostumbra tener un Hto de 49 a 50%, que baja bruscamente a 42%, puede padecer anemia aunque esta cifra sea normal. De la misma forma, los individuos que viven en zonas de grandes alturas y los fumadores crónicos son normalmente policitémicos, de esta manera en ellos

un Hto o Hb "normal" puede significar anemia. Debe considerarse que el Hto y la Hb relacionan los GR con el plasma de modo que si aumenta el volumen plasmático (hemodilución) puede encontrarse un Hto y Hb bajos simulando una falsa anemia como sucede en la hipoproteinemia, insuficiencia cardíaca, hiperesplenismo, etc. Lo opuesto puede suceder en casos de deshidratación en que la disminución del volumen plasmático aumenta artificialmente el número de GR, de modo que los pacientes que realmente son anémicos en condiciones de deshidratación podrían tener valores medidos de GR, Hto y Hb normales.

3. ESTUDIO DE LABORATORIO

3.1. Recuento de GR, Hto y Hb

Actualmente los sistemas analíticos bien estandarizados y sometidos a un riguroso control de calidad, ofrecen valores hematológicos de exactitud y reproducibilidad dentro de los límites clínicamente útiles, tanto para el diagnóstico de las anemias como para el seguimiento de su evolución y el control del tratamiento.

El hemograma proporciona información inicial muy importante para el diagnóstico de anemia.

Al nacer el **recuento de GR** es más elevado; luego, a partir de los dos meses siguientes, ocurre una disminución gradual de los mismos. Posteriormente sigue un incremento, también gradual, hasta alcanzar los valores del adulto. En la pubertad se presenta una diferencia según sexo, con recuentos menores en las mujeres en relación con los hombres. Su valor normal es en mujeres: 3,9-5,4 $x10^6$ /µl, hombres: 4,0-6,0 $x10^6$ /µl.

El **hematocrito** es el porcentaje que, del volumen total de la sangre, corresponde a los GR. Es una medición compuesta por el tamaño y número de GR. Como se indicó en el punto 2, los valores normales varían según el sexo y la edad.

La **hemoglobina** es el principal componente de los eritrocitos y su función es transportar el oxígeno y dióxido de carbono. Su valor es más importante que el de los GR ya que la capacidad de la sangre para combinarse con el oxígeno es directamente proporcional a la concentración de Hb. Al igual que el recuento de GR y el Hto, los valores normales dependen de la edad y sexo (ver punto 2).

3.2. Índices eritrocitarios

Los índices eritrocitarios son muy importantes para clasificar las anemias desde el punto de vista morfológico y por lo tanto para iniciar su estudio diagnóstico.

El **volumen corpuscular medio** (VCM) es una expresión, en términos absolutos, del volumen o tamaño promedio de los eritrocitos. Se determina en forma directa con contadores celulares automatizados; cada GR pasa a través de un orificio por donde fluye una corriente eléctrica; la célula produce un pulso de

voltaje cuya magnitud es proporcional al volumen celular (ver capítulo 27). Sin embargo, también puede calcularse a partir del Hto y el recuento de GR. El valor normal es de 80-100 fL Su determinación permite clasificar las anemias en normocíticas, microcíticas y macrocíticas.

La **concentración de Hb corpuscular media** (CHCM), define la concentración de Hb promedio por mL de eritrocitos (ver capítulo 27). En adultos los valores normales son de 32 a 36%. Sobre la base de valores de CHCM, las anemias pueden ser clasificadas como normocromas, o hipocromas (CHCM: < 32%).

La **Hb corpuscular media** (HCM), corresponde al valor promedio de la Hb contenida en cada hematíe. Los valores normales van de 28 a 32 pg. La HCM siempre debe relacionarse con la CHCM y la VCM. Valores menores de 27 pg se observan en las anemias hipocromas.

3.3. Recuento de reticulocitos, índice reticulocitario y fracción de reticulocitos inmaduros (IRF)

El recuento reticulocitario valora la producción de GR, permitiendo clasificar las anemias en regenerativas o arregenerativas. Se determina por recuento directo en el frotis mediante una tinción con azul de cresil brillante o de forma automática con los contadores electrónicos y se expresa en porcentaje o como número absoluto sobre el número de eritrocitos, siendo normal 0.5-2% y 25 - 85 x 10^3/µL, respectivamente. Si el número absoluto es mayor de 100 x 10^3/µL, indica una eritropoyesis aumentada (médula ósea) en respuesta a la anemia; se observa en las anemias regenerativas (ej. anemias hemolíticas). El recuento porcentual de reticulocitos podría dar un valor falsamente elevado en anemias con disminución importante del número de eritrocitos. Para evitar esta distorsión se debe usar el recuento absoluto de reticulocitos o el índice de producción reticulocitaria (IPR) según la fórmula: IPR = IR/2, donde IR (índice reticulocitario) se determina con la fórmula: IR = porcentaje reticulocitos x Hto paciente x 100/ Hto normal (Hombres: 45, Mujeres: 40). Los IPR menores de 2, son propios de las anemias arregenerativas y los mayores de 2-3 de las anemia regenerativas.
Recientemente, se ha postulado a la fracción de reticulocitos inmaduros (IRF), como un parámetro útil para evidenciar respuesta reticulocitaria. Hace referencia a la cuantificación de la fracción más joven de reticulocitos presentes en circulación periférica. Durante el proceso de maduración de las células eritroides, el eritroblasto ortocromático pierde su núcleo y se convierte en un reticulocito, permaneciendo en la médula ósea durante tres días. Luego se libera a circulación donde se completa su maduración en un día. Este proceso representa cambios morfológicos, bioquímicos y funcionales que conducen a la remodelación de la membrana, variaciones del volumen, eliminación de organelos y disminución del ARN citoplasmático. Se ha intentado clasificar a los reticulocitos de acuerdo a su madurez, teniendo en cuenta la cantidad y distribución de ARN presente en el citoplasma. Para determinar la IRF, los analizadores hematológicos utilizan dispersión de luz, discriminando por tamaño celular entre eritrocitos, reticulocitos, fragmentos de glóbulos rojos y plaquetas. Por otra parte, los

analizadores hematológicos usan tecnología de fluorescencia para evidenciar el contenido de ARN; así puede identificarse a las diferentes poblaciones de reticulocitos según tamaño y cantidad de ARN: fracción reticulocitaria con fluorescencia baja (LFR), media (MFR) y alta (HFR). El recuento de la MFR y HFR se corresponde con las formas reticulocitarias más inmaduras y constituye la IRF. Se ha propuesto como un marcador temprano de recuperación medular útil para el seguimiento de pacientes post-trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TPH).También se ha propuesto la medición rutinaria de la IRF para el manejo de pacientes sometidos a quimioterapias. Otros investigadores han estudiado el parámetro para el diagnóstico y seguimiento de las anemias, por ejemplo, la IRF en combinación con el recuento de reticulocitos puede ser útil para diferenciar la esferocitosis hereditaria (HS) de otros trastornos hemolíticos, ya que la HS es caracterizada por un recuento de reticulocitos sin aumento de la IRF, mientras que otras anemias hemolíticas presentan además del aumento del recuento de reticulocitos, una IRF elevada.

4. MECANISMOS DE ADAPTACIÓN Y SINTOMATOLOGÍA

4.1. Mecanismos de adaptación

La principal función de los eritrocitos es transportar el oxígeno a los tejidos. El adulto normal requiere 250 mL de oxígeno por minuto. La capacidad de transporte de oxígeno por la sangre normal es de 1.34 mL por gramo de hemoglobina o 20 mL de O_2 por 100 mL de sangre.

La consecuencia de la anemia es la hipoxia tisular; si esta alteración se desarrolla en forma paulatina permite el desarrollo de mecanismos de adaptación que tratan de mantener la oxigenación de los tejidos:

a) Aumento del 2,3 difosfoglicerato (2,3-DPG) eritrocitario. El aumento del 2,3 DPG se asocia a disminución de la afinidad de la Hb por el oxígeno, por lo que aumenta su liberación a los tejidos. En algunas anemias, como en el déficit de piruvato quinasa que desde el principio presentan aumento de 2,3-DPG, los síntomas son menores para el mismo descenso de la Hb. En algunas hemoglobinopatías que presentan Hb con disminución de la afinidad por el oxígeno, ocurre lo mismo; en estos casos se explica porque la liberación de oxígeno es mayor y, por lo tanto, el síndrome anémico es más leve.

La hipoxia celular estimula el metabolismo anaeróbico y la acumulación de ácido láctico, con lo cual la curva de disociación de la hemoglobina se desplaza a la derecha (efecto Bohr).

b) Aumento de la producción de GR. La disminución de la oxigenación renal conlleva un aumento de la producción de eritropoyetina para aumentar la producción de GR. Este mecanismo es lento y es efectivo si la eritropoyesis es normal. La maduración normal de eritrocitos en la médula ósea demora 7 días, pero el estímulo producido por la eritropoyetina reduce dicho período a 3-4 días.

c) Redistribución sanguínea. Algunos órganos como el cerebro y el corazón necesitan para su funcionamiento una concentración de oxígeno mantenida por lo que en la anemia se redistribuye el flujo sanguíneo de otros sectores como piel y riñón hacia órganos vitales como los antes mencionados. El organismo produce una redistribución del flujo sanguíneo con vasoconstricción cutánea y la consiguiente palidez, también debida a la disminución de la Hb. La vasoconstricción esplénica causa anorexia y náuseas y la vasoconstricción renal produce un aumento de la secreción de aldosterona con retención de líquidos y hemodilución.

d) Estimulación cardíaca. Es el mecanismo compensador más importante, aumenta la fuerza de contracción ventricular y la frecuencia de la misma. Además produce una vasodilatación arteriolar a nivel visceral con vasoconstricción cutánea y muscular esquelética. Todo ello produce una hiperkinesia circulatoria que se manifiesta clínicamente (palpitaciones, taquicardia con pulso saltón, soplos cardíacos funcionales, aumento de la presión arterial diferencial, cefaleas pulsátiles) y que sumada a la disnea, mareos y palidez mucocutánea, permiten el diagnóstico de síndrome anémico.

4.2. Síntomas y signos

En la aparición de los síntomas influyen varios factores, entre ellos es importante el tiempo en que se desarrolla la anemia. Una anemia que se instala en forma lenta puede que no presente síntomas o estos sean muy leves; en cambio frecuentemente los provoca aquella de instalación brusca. Otros factores que influyen en la aparición de síntomas son la edad y el estado previo de salud.

En la (tabla 18-2) se mencionan las manifestaciones clínicas más importantes del síndrome anémico.

Los signos que suelen apreciarse en la exploración física de los pacientes con anemia son:

- Palidez: secundaria a la disminución de aporte de sangre a la piel para aumentarla en otros órganos más vitales.
- Taquicardia: mecanismo compensador del corazón; a veces también soplo cardiaco funcional.
- Taquipnea: aumento de la frecuencia respiratoria.
- Hipotensión: manifestación de la pérdida de volumen sanguíneo en casos de anemia aguda.
- Signología específica: en los casos de anemia hemolítica es habitual encontrar ictericia (conjuntiva y piel) y esplenomegalia. En los pacientes con déficit de vitamina B12 pueden existir alteraciones en el sistema nervioso.

Tabla 18-2. Manifestaciones clínicas del síndrome anémico

Manifestaciones generales	
	Astenia
Manifestaciones cardiovasculares	
	Palpitaciones
	Disnea de esfuerzo
	Hipotensión
Manifestaciones neurológicas	
	Cefalea
	Mareo, vértigo
	Somnolencia, confusión, irritabilidad
	Ruidos en los oídos (tinitus)
Manifestaciones en la piel	
	Palidez
	Fragilidad de las uñas
En casos de anemia severa o de rápida instalación	
	Piel fría y húmeda
	Disminución del volumen de orina
	Dolor precordial (angor)
Otros síntomas y signos dependerán del tipo de anemia y su causa o etiología.	

5. CLASIFICACIONES DE LAS ANEMIAS

Las anemias se originan generalmente por uno de los siguientes mecanismos básicos: eritropoyesis deficiente, hemólisis excesiva o hemorragia (aguda o crónica).

En hombres la principal fuente de sangrado es el sistema digestivo, en tanto que en la mujer corresponde a las pérdidas de sangre con la menstruación. En las anemias secundarias a eritropoyesis deficiente, es útil observar las alteraciones morfológicas de los GR, así la presencia de eritrocitos microcíticos pueden sugerir deficiencia de hierro, talasemias, defectos en la síntesis de hemoglobina o anemia asociada a enfermedades crónicas; por el contrario, los GR macrocíticos se relacionan a defectos en la síntesis de DNA, como resultado de la deficiencia de vitamina B_{12}, ácido fólico o de la quimioterapia con metotrexato o hidroxyurea. Por su parte, las anemias normocíticas-normocrómicas aparecen como consecuencia de un mecanismo hipoproliferativo de la médula ósea o hemólisis periférica. En cuanto a este último es necesario descartar los

mecanismos fisiopatológicos básicos más comúnmente asociados como son el secuestro esplénico y la hemólisis mediada por anticuerpos, y menos frecuentes las causadas por alteraciones propias de los hematíes, como son las membranopatías, enzimopatías y hemoglobinopatías.

Desde el punto de vista clínico, se utilizan dos clasificaciones: morfología y fisiopatológica.

5.1. Clasificación morfológica

La clasificación morfológica de las anemias (tabla 18-3) tiene una importante utilidad clínica. Se basa en los cambios que presentan los GR en el tamaño (VCM) y en el contenido de Hb (CHCM, HCM). Estos cambios son detectados por los contadores celulares y observados con microscopía óptica en los frotis sanguíneos (ver capítulo 27). Considerando que el valor normal del VCM es entre 80 y 100 fL y la CHCM entre 32 y 36%, las anemias se pueden clasificar en tres tipos:

- Microcíticas (VCM < 80 fL). Se asocia a trastornos en la síntesis de la Hb, como por ejemplo anemia ferropriva y talasemias. En general se acompañan de disminución de la CHCM que define la hipocromía.
- Macrocíticas (VCM > 100 fL). Se presentan en anemias con trastornos de la maduración eritroide, como por ejemplo las anemias megaloblásticas.
- Normocíticas-normocrómicas. En este grupo de anemias, que presentan VCM y CHCM normal, se incluyen las anemias de las enfermedades crónicas, las anemias hemolíticas, y las anemias de causa medular (Ejs. leucemias, mieloma múltiple, aplasia medular).

La clasificación morfológica de las anemias sumada a estudios complementarios, permite en la mayoría de los casos, formular el diagnóstico del tipo de anemia (ver los capítulos específicos de cada tipo de anemia y los capítulos 27, 28 y 29).

5.2. Clasificación fisiopatológica

La clasificación fisiopatológica de las anemias se basa en la respuesta de la médula ósea para compensar la anemia, así se les clasifica en dos grupos: anemias arregenerativas y anemias regenerativas. A continuación se describen algunas características de cada grupo y se indican algunos ejemplos.

Tabla 18-3. Clasificación morfológica de las anemias

Anemias macrocíticas	
	Hematológicas
	Anemia megaloblástica
	Anemias hemolíticas
	Síndromes mielodisplásicos
	No hematológicas
	Alcoholismo
	Hepatopatía crónica
Anemias microcíticas	
	Anemia ferropriva
	Talasemias
	Microesferocitosis Hereditaria
Anemia normocíticas	
	Anemia aplásica
	Infiltración medular (Mieloptisis)
	Anemias secundarias a enfermedad crónica

5.2.1. Anemias arregenerativas

En estas anemias la médula ósea es incapaz de producir GR en forma adecuada para compensar la anemia, ya sea por un defecto de la misma (Ejs. anemia aplásica, leucemias) o por falta de nutrientes (hierro, vitamina B12, etc.). En este tipo de anemias la cifra de reticulocitos es normal o disminuida y el IPR es menor a 2, indicando que el origen de la anemia es a nivel central (médula ósea). A continuación se mencionan las causas más importantes de anemias arregenerativa:

- Disminución de las células progenitoras de GR o de todas las líneas medulares (además granulocitos y plaquetas): Anemia aplásica por tóxicos industriales (benceno), drogas (cloranfenicol, dipirona, antiinflamatorios no esteroidales), citostáticos (antineoplásicos) radiaciones ionizantes y de causa desconocida (anemia aplásica idiopática).
- Infiltración de la médula ósea por células extrañas que reemplazan las células progenitoras: blastos leucémicos, metástasis de carcinomas, tejido conectivo fibroso (mielofibrosis), etc. En conjunto se les denomina anemias mieloptísicas.
- Las células eritropoyéticas son normales pero no reciben los factores nutritivos necesarios para producir eritrocitos. Son las denominadas anemias carenciales. El déficit puede ser de: (a) hierro, por falta de aporte (carencia de hierro) o con aporte normal pero incapacidad de utilizar el hierro (anemia secundaria a enfermedades crónicas), (b) vitamina B_{12} y/o ácido fólico (anemias megaloblásticas) y (c) hormonas (hipotiroidismo, hipopituitarismo, hiposuprarrenalismo, hipogonadismo masculino, disminución de eritropoyetina en la insuficiencia renal).

Tabla 18-4. Clasificación fisiopatológica de las anemias

Estado de la eritropoyesis	Causa de la anemia	Situaciones clínicas
Anemias arregenerativas		
Por depresión	Infecciones extramedulares	Subagudas o crónicas
	Mesenquimopatías	Lupus, esclerodermia
	Déficit de Hierro	Carencial, pérdida exagerada, defecto en absorción, transporte o utilización
	Síntesis alterada de DNA	Anemia perniciosa, Ca gástrico, difilobotiasis, diverticulitis intestinal, embarazo, etilismo crónico, cirrosis hepática, tratamientos citostáticos (citosina arabinosa), otras drogas).
	Déficit de eritropoyetina	Nefropatías crónicas difusas, ciertos hipernefromas
	Déficit de tiroxina	Mixedema
	Déficit de transferrina	Nefrosis, malabsorción, atransferrinemia congénita
Por agresión	Intoxicaciones endógenas	Uremia, cáncer metastásico
	Intoxicaciones exógenas	Benzol, cloranfenicol, fenilbutazona, citostáticos, etc.
	Infecciones intramedulares	Hepatitis, micosis diseminada
	Procesos autoinmunes	ciertas virosis
Por sustitución	Proliferaciones celulares	Leucemias, linfomas, metástasis neoplásicas difusas mieloesclerosis, osteosclerosis, tesaurismosis, sarcoidosis
Anemias regenerativas		
Anemias Hemolíticas		
A. hemolíticas intracorpusculares	Membranopatías	Esfero, elipto, acanto y pirocitosis
A. hemolítica extracorpusculares		hereditarias, hemoglobinuria paroxística nocturna
	Hemoglobinopatías	HbS, Hb inestables, HbS, HbC y otras; talasemias
	Enzimopatías	Déficit de G6PDH, PK y otras enzimas
	Autoanticuerpos	Linfomas, leucemias, lupus, cepas, virosis, idiopatías
	Aloanticuerpos	Sensibilización anti-Rh y otras, accidentes transfusionales

	Traumatismos constantes	Válvulas cardíacas mal implantadas, marcha exagerada
	Microcirculación alterada	Vasculitis, poliarteritis nodosa, coagul. Intravascular diseminada
	Grandes hematomas	Cefalohematoma del recién nacido, traumatismos violentos.
	Físicas	Congelamiento, quemaduras extensas, irradiación
	Químicas	Fenilhidrazina, anilinas, otros oxidantes
	Toxi-infecciosas	Clostridium, estrepto y estafilococo, otros microorganismos
	Parasitarias	Crisis maláricas, bartonelosis
Anemias por hemorragia aguda		

5.2.2. Anemias regenerativas

Las anemias regenerativas son aquellas en que existe pérdida de GR por hemorragia o por hemólisis (intravascular o extravascular). Son anemias de causa periférica; la médula ósea intenta compensar la anemia aumentando la producción de hematíes, por lo cual el recuento de reticulocitos aumenta (IPR: > 3).

a) Anemias hemolíticas

Las anemias hemolíticas pueden deberse a causas propias de los GR (Anemias hemolíticas intracorpusculares) o ajenas a ellos (Anemias hemolíticas extracorpusculares) (ver capítulo 8).

Las **anemias hemolíticas intracorpusculares,** pueden deberse a alteraciones en la membrana (Ej. Esferocitosis hereditaria), defectos enzimáticos (Ej. Déficit de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa) y alteraciones en la hemoglobina (Ej. Talasemias).

Las **anemias hemolíticas extracorpusculares,** pueden tener como causa mecanismos inmunes (alo o autoanticuerpos), agentes tóxicos e infecciosos (plomo, venenos de serpientes, toxinas bacterianas, parásitos), factores mecánicos (anemia hemolítica microangiopática y anemia hemolítica por prótesis cardíacas), y secuestro de hematíes en el bazo (hiperesplenismo).

b) Anemias post-hemorrágicas

La gravedad y síntomas de la anemia están dados por el volumen de sangre perdido y el tiempo de evolución del proceso de base, que puede o no dar tiempo a que el organismo utilice mecanismos compensatorios. Las hemorragias pueden ser agudas o crónicas (ver capítulo 9).

En las anemias por hemorragia aguda, la pérdida de sangre puede ser evidente (hematemesis, melena, ginecorragia, hemoptisis, epistaxis, hematuria) o no serlo (hemoperitoneo, hematoma retroperitoneal, hemotórax, fractura de cadera o pelvis). El aumento de la eritropoyesis puede tardar en manifestarse, de manera que es posible no encontrar reticulocitosis en las primeras horas de la hemorragia. Por otra parte, la Hb liberada de los GR extravasados en los lugares de acumulación de la sangre en las hemorragias ocultas, sufre la transformación que lleva a la producción de bilirrubina no conjugada que al pasar a la sangre produce hiperbilirrubinemia. Esta, combinada con la anemia y la reticulocitosis puede simular una anemia hemolítica.

En las anemias por hemorragia crónica, la pérdida de GR implica una disminución del hierro (presente en la hemoglobina) lo que produce un agotamiento de sus reservas. Esto explica que se comporte como una anemia arregenerativa (sin reticulocitosis), microcítica e hipocrómica.

El tratamiento adecuado de las anemias requieren establecer previamente los mecanismos subyacentes.

Los niños, las mujeres y los ancianos son los grupos de población en mayor riesgo para desarrollar este tipo de alteraciones, razón por la cual el médico ha de prestar particular atención a su evaluación.

Basándose en una adecuada anamnesis, examen físico minucioso, y en el estudio riguroso del hemograma con recuento de reticulocitos, así como la realización de algunos exámenes complementarios, se puede formular el diagnóstico correcto de la mayoría de las anemias.

6. LECTURAS SUGERIDAS

Blackall, D.P., Marques, M., “Hemolytic uremic syndrome revisited: Shiga toxin, factor H, and fibrin generation”. *Am J Clin Pathol.* 121 Suppl:S81-8. 2004.

Dhaliwal, G.; Cornett, P.A; Tierney, L.M. Jr. “Hemolytic anemia”. *Am Fam Physician;* 69(11):2599-606, 2004.

Gasche, C.; Lomer, M.C.; Cavill, I.; Weiss, G. Iron, anaemia, and inflammatory bowel diseases. Gut; 53(8):1190-7, 2004.

Gilsanz, F. “Anemia: manifestaciones clínicas y clasificación”, *Medicine;* 7(28):1169-1171, 1996.

Hill, J.; Walsh, R.M.; McHam, S.; Brody F.; Kalaycio, M. “Laparoscopic splenectomy for autoimmune hemolytic anemia in patients with chronic lymphocytic leukemia: a case series and review of the literature”. *Am J Hematol.*;75(3):134-8, 2004.

Maciejewski, J.P., Selleri, C. "Evolution of clonal cytogenetic abnormalities in aplastic anemia". *Leuk Lymphoma;* 45(3):433-40, 2004.

Shah, S., Vega, R. "Hereditary spherocytosis". *Pediatr Rev.;* 25(5):168-72, 2004.

Ricard, A. "Protocolo de actitud diagnóstica en las anemias", *Medicine;* 7(28):1220-1222, 1996.

Richard Lee, G., **Wintrobe's Clinical Hematology,** Capítulos 29 y 30, Décima edición, Editorial Williams & Wilkins, Baltimore, 1998.

Piva E et al. Clinical utility of reticulocyte parameters. Clin Lab Med. 2015; 35(1):133-63.2, 2015.

Benavidez, C., Garcia, R., Goedelmann, C., Gonzalez Cid, P., Sala, M., & Durando, M. Fracción de reticulocitos inmaduros. Revista Hematología, 23(1), 73–76, 2019.

Testa, U. "Apoptotic mechanisms in the control of erythropoiesis". *Leukemia;*18(7):1176-99, 2004.

Wilson, A.; Yu H.T.; Goodnough, L.T.; Nissenson, AR. "Prevalence and outcomes of anemia in rheumatoid arthritis: a systematic review of the literature". *Am J Med.;*116 Suppl 7A:50S-57S, 2004.

Wingard R. "Increased risk of anemia in dialysis patients with comorbid diseases". *Nephrol Nurs* J;31(2):211-4, 2004.

Capítulo

19

ANEMIA FERROPRIVA

Manuel Olivares G., Iván Palomo G.

Resumen

1. Introducción

2. Metabolismo del hierro

3. Deficiencia de hierro
- 3.1. Cambios con el desarrollo y requerimientos de hierro
- 3.2. Etiopatogenia de la deficiencia de hierro
- 3.3. Cuadro clínico y consecuencias
- 3.4. Diagnóstico de laboratorio de la deficiencia de hierro
- 3.5. Prevención y tratamiento de la deficiencia de hierro

4. Lecturas sugeridas

RESUMEN

El hierro (Fe) es un elemento esencial para el ser humano pero en exceso puede ser tóxico. La homeostasis de Fe es regulada por su absorción a través del enterocito. El Fe se absorbe por dos vías, una para el Fe hemínico (Fe-hem) y la otra para el Fe no-hemínico (Fe no-hem). El Fe-hem parece solo ser afectado por proteínas animales que facilitan su absorción y por calcio que puede inhibir su absorción. En cambio, el Fe no-hem es influenciado por una gran cantidad de factores que disminuyen su absorción (calcio, fosfato, caseína, polifenoles, fitalo) o la favorecen (ácido ascórbico y compuestos derivados de la digestión de las carnes).

La deficiencia de hierro es la deficiencia nutricional más prevalente y la principal causa de anemia. Además de las manifestaciones propias de la anemia, se han descrito otras manifestaciones no hematológicas. Para el diagnóstico de la deficiencia de hierro se cuenta con una batería de exámenes de laboratorio que incluye pruebas de tamizaje como la hemoglobina, hematocrito y volumen corpuscular medio y otras pruebas de confirmación en que la más utilizada es la ferritina sérica. La prevención de la deficiencia de Fe incluye cambios en los hábitos alimentarios, fortificación de los alimentos y la suplementación con hierro. El tratamiento consiste en la administración de hierro oral en una dosis diaria de 3-5 mg/kg de hierro elemental en el niño y 80 a 120 mg en el adulto.

1. INTRODUCCIÓN

El hierro es un elemento traza esencial que participa en numerosos procesos biológicos indispensables para la vida, como el transporte y almacenamiento del oxígeno, la fosforilación oxidativa, el metabolismo de neurotransmisores y la síntesis de DNA y RNA. Sin embargo, las mismas propiedades que lo hacen útil le proporcionan características tóxicas cuando se encuentra en exceso. Por ello nuestro organismo cuenta con mecanismos homeostáticos destinados a evitar una posible alteración en el contenido de hierro corporal que lleve a una deficiencia o un exceso de este elemento. La deficiencia de hierro es con mucho el mayor problema de salud relacionado con este mineral.

2. METABOLISMO DEL HIERRO

Dado que en el capítulo 8 el metabolismo de hierro se trata en detalle, aquí solo se mencionarán algunos aspectos. La mayor parte de este mineral se encuentra formando parte de la hemoglobina, la que contiene alrededor del 70 % del hierro total del organismo; le sigue en cuantía (25%) el depositado en el sistema reticuloendotelial y células parenquimatosas hepáticas en la forma de ferritina y hemosiderina. Un 4 % se encuentra en los músculos como mioglobina y menos

del 1% se encuentra en diversos sistemas enzimáticos que contienen este mineral o lo utilizan como cofactor.

La mayor parte de las necesidades de hierro del organismo son suplidas por la reutilización del hierro proveniente de la destrucción de los glóbulos rojos senescentes. El hierro producto del catabolismo de la hemoglobina en el sistema reticuloendotelial, es exportado por el transportador ferroportina, uniéndose en el plasma a la transferrina, la que lo entrega vía receptor de transferrina a los precursores eritroides de la médula ósea, así como a las otras células del organismo. En el adulto el 95% del hierro empleado en la síntesis de hemoglobina proviene de este reciclaje, mientras que en un lactante de 1 año este valor es de solo un 70% debido a las necesidades impuestas por el crecimiento, siendo por tanto este último más dependiente del aporte externo de este mineral.

Las pérdidas basales de hierro son bastante restringidas y muy poco reguladas. Estas ocurren principalmente a nivel del intestino por un sangramiento fisiológico y descamación de los enterocitos que acaece cada 3 a 5 días. Menos importantes son las debidas a la descamación de piel y fanéreos, sudoración o eliminación urinaria. En la mujer en edad fértil se agrega la pérdida por la menstruación.

El hierro se encuentra en la dieta en dos formas que tienen vías de absorción diferentes. La mayor parte se encuentra como hierro no hem, presente en las sales de hierro, alimentos de origen vegetal y algunos de origen animal como la leche. Una proporción menor (10 a 15%) está presente como hierro hem en las carnes (mioglobina) y la sangre (hemoglobina).

El hierro es liberado durante la digestión. El hierro no hem es reducido por la acción ácido clorhídrico y de la enzima DctyB presente en el ribete estriado del enterocito y es incorporado en citoplasma de este por el transportador de metales divalentes (DMT1). Por otra parte, este hierro interactúa con factores intraluminales, presentes en la dieta o propios del intestino, que van a inhibir o facilitar su absorción. Entre los inhibidores están los polifenoles (té, café, legumbres, espinacas, cereales), los fitatos, calcio, carbonatos, oxalatos, fosfatos, el salvado y la yema de huevo. De los facilitadores de la absorción, el ácido ascórbico es el que tiene el efecto más potente. También son favorecedores las carnes, pescados, algunos aminoácidos como la cisteína, algunos ácidos orgánicos (láctico, cítrico, málico, tartárico) y azúcares. Debido a estas interacciones la absorción del hierro no hem es muy variable. En la dieta habitual hay un predominio de los ligandos inhibidores, los que actúan formando complejos de hierro insolubles.

El grupo hem es absorbido intacto en el enterocito por un proceso aún no totalmente esclarecido. En el interior de la célula el hierro es liberado por la enzima hemoxigenasa, incorporándose al “pool” de hierro intracelular. Su absorción es de entre 20 a 25% y es favorecida por algunas proteínas de origen animal e inhibida por el calcio.

En el enterocito el hierro es exportado a la circulación por el transportador ferroportina, uniéndose a la transferrina plasmática, previa oxidación por la hefestina.

La hepcidina, sintetizada principalmente en el hígado, provoca la internalización de la ferroportina en las células (enterocito, macrófagos del sistema reticuloendotelial, células de Kupffer y enterocitos) donde es degradada en los lisosomas, reduciendo así la exportación de hierro y consiguiente unión a la transferrina plasmática. Además, al aumentar la concentración del hierro en el enterocito, disminuye la expresión de DMT1, lo que produce secundariamente una disminución de la captación apical de hierro, mientras que el aumento del hierro en los macrófagos del sistema reticuloendotelial y células de Kupffer, incrementa la expresión de ferritina, favoreciendo así el almacenamiento de hierro en esas células. De tal modo que un aumento de la hepcidina produce una disminución de la absorción de hierro y de la entrega de hierro desde los depósitos de este mineral, ocurriendo lo contrario con la disminución de la hepcidina. La producción hepática de hepcidina está regulada por diversos mecanismos. Uno de ellos son los niveles circulantes de hierro, en que a mayores niveles circulantes de hierro se secreta más hepcidina. También la inflamación, mediada por la interleuquina 6, favorece la secreción de hepcidina. Mientras que la hipoxia y el aumento de la eritropoyesis reducen la producción de hepcidina.

3. DEFICIENCIA DE HIERRO

3.1. Cambios con el desarrollo y requerimientos de hierro

Los principales condicionantes de los requerimientos de hierro son la substitución de las pérdidas basales, pérdida por la menstruación en la mujer en edad fértil, necesidades impuestas por el crecimiento (niños y adolescentes), transferencia al feto y aumento de la masa de hemoglobina en la embarazada.

El feto adquiere el hierro en forma activa a través de la placenta. La mayor transferencia de hierro al feto ocurre a partir de las 30 semanas de embarazo. El contenido de hierro del feto es directamente proporcional a su masa corporal, estimándose en 75 mg/kg. El recién nacido de bajo peso de nacimiento, tiene por tanto un menor contenido total de este nutriente. Al nacer la concentración de hemoglobina es mucho más alta que en otros períodos de la infancia siendo esta cifra menor en el prematuro y en la ligadura precoz del cordón. Este gran aumento de la masa de hemoglobina constituye una verdadera reserva de hierro. En el período postnatal ocurre un gradual descenso de la concentración de hemoglobina por el freno de la eritropoyesis, debido al aumento de la saturación de O_2 que ocurre una vez iniciada la respiración y a la sobrevida disminuida de los eritrocitos fetales. Este descenso llega a su máximo a las 6 a 8 semanas de vida, siendo más precoz y pronunciado en el pretérmino. El hierro proveniente del catabolismo de la hemoglobina queda depositado como reserva en el sistema reticuloendotelial y células parenquimatosas hepáticas, siendo reutilizado una vez reiniciada la eritropoyesis. Los depósitos así formados permiten que el recién nacido de término sea independiente del aporte de hierro exógeno

durante los 4 a 6 primeros meses de vida. El recién nacido de bajo peso de nacimiento por tener una reserva de hierro menor y una mayor velocidad de crecimiento, puede ya tener depletados sus depósitos a los 2 a 3 meses de vida.

Los niños y adolescentes tienen necesidades de hierro aumentadas debido a las demandas impuestas por el crecimiento.

En el embarazo ocurren cambios en la volemia determinados por variaciones en la masa eritrocitaria y en el volumen plasmático. Ambos componentes son controlados separadamente. Todos estos cambios en el volumen plasmático y en la masa eritrocitaria determinan la existencia de una anemia fisiológica del embarazo por hemodilución. La necesidad total de hierro durante un embarazo es de 1040 mg. En el caso de parto por cesárea este requerimiento es mayor, ya que la cantidad de sangre perdida es casi el doble que en un parto normal.

3.2. Etiopatogenia de la deficiencia de hierro

La deficiencia de hierro es la enfermedad nutricional más prevalente en el mundo y los grupos más vulnerables son los lactantes, niños, adolescentes, mujeres en edad reproductiva y embarazadas. La Organización Mundial de la Salud estima que sobre un 50% de las anemias son debidas a la deficiencia de hierro.

La deficiencia de hierro se puede tener un origen nutricional o ser secundaria a una patología (Tabla 19-1). En la infancia la causa más frecuente de la carencia de hierro es nutricional, originada por la dificultad de cubrir los mayores requerimientos de este mineral por la dieta habitual, predominantemente láctea. El lactante debido a sus elevados requerimientos es particularmente susceptible a la carencia de hierro. Esta predisposición es aún mayor cuando el contenido de hierro al nacer está disminuido como en el prematuro o en embarazos múltiples. Esta susceptibilidad se incrementa en el niño con lactancia artificial, a menos que reciba fórmulas lácteas fortificadas, ya que el hierro de la leche de vaca es pobremente absorbido. Por el contrario el lactante de término alimentado con leche materna exclusiva, pese al bajo contenido de hierro de esta, se encuentra protegido hasta los 6 meses de vida debido a la excelente biodisponibilidad del hierro de esta leche (50%). En el niño mayor debido a su menor ritmo de crecimiento y a una dieta más variada, la etiología nutricional es menos prevalente, siendo habitualmente la deficiencia una situación que se arrastra desde el período de lactante. En esta etapa de la vida adquieren importancia otras causas, especialmente las pérdidas sanguíneas aumentadas y el síndrome de malabsorción. De los sangramientos el más frecuente es el digestivo. En los países tropicales una causa común de pérdida crónica de sangre son infestaciones por parásitos intestinales hematófagos, como la ancilostomiasis y la trichocefalosis masiva. Una infestación severa por *Schistosoma haematobium* puede producir una pérdida importante de sangre por la vejiga y el *Schistosoma mansoni* por el intestino. En la mujer en edad reproductiva no embarazada la principal causa de deficiencia de hierro es un sangramiento menstrual aumentado asociado a una dieta que tiene cantidades insuficientes de hierro y/o presenta una baja

biodisponibilidad de este. En la embarazada la cantidad promedio de hierro absorbido requerido diariamente es de 0,8 mg en el primer trimestre (menor que mujer no gestante), concentrándose la mayor parte de los requerimientos en los dos últimos trimestres, 4,4 mg en el segundo trimestre y 6,3 mg en el tercer trimestre en mujeres que comienzan su embarazo con depósitos ausentes o mínimos. Por otra parte, la absorción de hierro dietario es baja en el primer trimestre, para luego aumentar progresivamente a medida que declina la nutrición de hierro, llegando a triplicarse alrededor de la semana 36 de gestación. No obstante este aumento, es imposible cubrir los elevados requerimientos solo con el aporte de hierro de la dieta. Se estima, que a pesar del aumento de la absorción de hierro, se requieren 500 mg de depósitos de hierro para cubrir el déficit neto de hierro impuesto por el embarazo. Esta cuantía de depósitos de hierro es difícil de encontrar aún en sociedades con altos ingresos económicos.

Tabla 19-1. Causas de la deficiencia de hierro

Depósitos de hierro disminuidos al nacer	Prematurez, ligadura precoz del cordón, sangramiento perinatal, deficiencia hierro de la madre en el embarazo
Bajo aporte de hierro por la dieta	Dieta con bajo contenido y/o baja absorción de hierro
Mala absorción	Síndromes de mala absorción, defecto genético de absorción de hierro
Requerimientos de hierro aumentados	Niños y adolescentes por crecimiento (muy rápido primer año), mujer en edad fértil por pérdida menstrual, embarazo
Pérdidas de hierro aumentadas	Sangramiento crónico o repetido, episodios repetidos o prolongados de diarrea. Parasitosis (Ancylostomiasis, Trichuriasis masiva, Schistosomiasis masiva)

En el hombre adulto y mujeres post-menopaúsicas la deficiencia de hierro es habitualmente la consecuencia de un sangramiento crónico más comúnmente del tracto gastrointestinal. En la mujer en edad fértil frecuentemente es la consecuencia de un aumento de la pérdida menstrual. Existen importantes variaciones individuales en la pérdida de hierro por la menstruación, sin embargo en una misma mujer esta variación entre diferentes períodos es pequeña. Por otra parte, los métodos anticonceptivos pueden alterar significativamente la pérdida

menstrual. La pérdida de hierro es menor a lo normal en mujeres que utilizan métodos anticonceptivos hormonales y mayor que lo normal cuando utilizan dispositivos intrauterinos.

Cuando el aporte de hierro es incapaz de suplir los requerimientos, se producen etapas progresivas de severidad de la deficiencia de hierro (Tabla 19-2). Inicialmente ocurre un agotamiento de los depósitos de hierro (deficiencia latente). Si el balance negativo continúa se pasa a la etapa siguiente en la que se encuentra comprometido el aporte tisular de hierro (eritropoyesis deficiente en hierro) y que se caracteriza inicialmente por un aumento de los receptores de transferrina séricos y algo más tarde una disminución de la saturación de la transferrina y un aumento de la protoporfirina libre eritrocitaria. En caso de persistir el déficit se llega a la última etapa en la cual existe una anemia, acompañada de microcitosis e hipocromía.

Tabla 19-2. Etapas de la deficiencia de hierro

Parámetro	Normal	Depósitos depletados	Eritropoyesis deficiente en hierro	Anemia ferropriva
Ferritina	N	↓	↓↓	↓↓
RTf	N	N	↑	↑↑
CHRet	N	N	↓	↓↓
PLE	N	N	↑	↑↑
Hierro sérico	N	N	↓	↓↓
TIBC	N	N	↑	↑↑
Sat. Transf.	N	N	↓	↓↓
Hemoglobina	N	N	N	↓
VCM	N	N	N	↓
CHCM	N	N	N	↓
HCM	N	N	N	↓

RFf: receptor de transferrina sérico, CHRet: contenido de hemoglobina del reticulocito, PLE: Protoporfirina libre eritrocitaria, TIBC: capacidad total de combinación de hierro, Sat. Transf: saturación de la transferrina, VCM: volumen corpuscular medio, CHCM: concentración de hemoglobina corpuscular media, HCM: hemoglobina corpuscular media

3.3. Cuadro clínico y consecuencias

Las manifestaciones son las propias de una anemia, asociada a manifestaciones no hematológicas consecuencia de la mal función de enzimas hierro dependientes. En la carencia de hierro se han descrito alteraciones de la capacidad de trabajo físico y de la actividad motora voluntaria, alteraciones de la inmunidad celular y capacidad bactericida de los neutrófilos, una posible mayor suscepti-

bilidad a las infecciones, alteración de la termogénesis, disminución de la velocidad de crecimiento, alteraciones funcionales e histológicas del tubo digestivo, falla en la movilización de la vitamina A hepática, alteraciones conductuales y del desarrollo mental y motor, alteraciones neurosensoriales como velocidad de conducción más lenta de los sistemas sensoriales auditivo y visual, alteraciones del tono neurovegetativo y ciclo sueño-vigilia. Existen evidencias que estas alteraciones neuro-conductuales no serían del todo recuperables con la terapia con hierro. En embarazadas la anemia severa se asocia a un aumento de la mortalidad materna y fetal. Por otra parte, estudios en los que se ha evaluado el efecto de la anemia ferropriva sobre el embarazo han demostrado que la anemia ferropriva que ocurre tempranamente en el embarazo se asocia a un riesgo 2,7 veces mayor de parto prematuro y 3,1 veces de bajo peso de nacimiento. El riesgo de parto prematuro 5 veces mayor cuando se le añade una metrorragia previa o concurrente. La deficiencia de hierro durante el embarazo impacta negativamente los depósitos de hierro del recién nacido.

3.4. Diagnóstico de laboratorio de la deficiencia de hierro

Para el diagnóstico de la deficiencia de hierro se cuenta con una batería de exámenes. Se dispone de un grupo de análisis sencillos de realizar y de bajo costo los que se utilizan en la pesquisa de esta patología (exámenes de tamizaje o "screening") y otros más complejos o más caros que se emplean para su confirmación. Entre los primeros se encuentran los determinados en un hemograma (hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio y otras constantes eritrocitarias tales como la CHCM y HCM, además de la apreciación del frotis sanguíneo. La prueba terapéutica con hierro se puede utilizar como un método sencillo de diagnóstico. Los exámenes confirmatorios incluyen las mediciones de la saturación de la transferrina, protoporfirina libre eritrocitaria, receptor de transferrina sérico y ferritina sérica.

La concentración de hemoglobina mide la última etapa de la carencia de hierro y su especificidad va a depender de la prevalencia de la carencia de este mineral en la población o grupo a estudiar. Los puntos de corte de hemoglobina utilizados para recomendados por la Organización Mundial de la Salud para el diagnóstico de anemia en una población a nivel del mar son: niños 6 a 59 meses de edad (11,0 g/dL), 5 a 11 años (11,5 g/dL), 12 a 14 (12,0 g/dL), mujeres no embarazadas ≥15 años (12,0 g/dL), embarazadas (11,0 g/dL) y hombres ≥15 años (13,0 g/dL). El hematocrito, si bien es más simple de realizar, es algo menos sensible que la hemoglobina en la detección de anemia.

Con relación al volumen corpuscular medio, cabe señalar que en el recién nacido y embarazada existe una macrocitosis fisiológica. La microcitosis no es exclusiva de la deficiencia de hierro, también se puede apreciar en otras condiciones en las que existe un defecto de la hemoglobinización de los precursores eritroides (talasemia, infección o inflamación crónica, intoxicación plúmbica, anemias sideroblásticas, etc.). Al inicio de la reducción de la concentración de hemoglobina en la deficiencia de hierro puede que no se aprecie la microcitosis. En los con-

tadores electrónicos se cuantifica el ancho de la distribución del volumen de los eritrocitos (RDW en la sigla en inglés), el que se encuentra aumentado en algunas variedades de anemias entre las cuales se encuentra la anemia ferropriva.

La prueba terapéutica certifica la existencia de la anemia ferropriva. Esta es una prueba fácil de realizar a escala individual, pero difícil en el ámbito poblacional. Consiste en administrar hierro medicinal en una dosis terapéutica (3-5 mg/kg de hierro elemental en niños y 80 mg diarios en adultos) durante un mes. Se considera que la prueba es positiva cuando el aumento de la concentración de hemoglobina es igual o superior a 1 g/dL. Una prueba positiva indica que el sujeto es verdaderamente anémico ferroprivo, incluso a pesar que pueda tener una hemoglobina dentro de los límites normales. Una prueba negativa, siempre que el sujeto haya recibido el hierro en dosis y tiempo adecuados, indica la inexistencia de una anemia ferropriva, no excluyendo una deficiencia de hierro en una etapa previa a la anemia.

La protoporfirina libre eritrocitaria aumenta cuando existe una disminución del hierro disponible en el eritroblasto para combinarse con la protoporfirina y formar hem, es por ello que se eleva en la eritropoyesis deficiente en hierro. Se puede medir mediante hematofluorómetros bastando una gota de sangre para su determinación por lo que se puede realizar en una muestra capilar. Valores aumentados se encuentran también en la intoxicación plúmbica y en la anemia de la inflamación/infección aguda y crónica.

Las mediciones del hierro sérico, capacidad total de combinación de hierro (TIBC) y saturación de la transferrina se utilizan frecuentemente como exámenes de confirmación de la deficiencia de hierro. El TIBC constituye una medida de la cantidad de transferrina circulante, proteína que normalmente se encuentra saturada en un tercio de su capacidad. Estos parámetros requieren de una macro muestra sanguínea obtenida en ayunas y en material libre de minerales. Por otra parte, el hierro sérico y saturación de la transferrina presentan una gran variabilidad, existiendo importantes fluctuaciones diarias (ciclo circadiano) e inter días. En la eritropoyesis deficiente en hierro ocurre una disminución del hierro sérico y un aumento de la transferrina, lo que determina que en esta condición exista una reducción de la saturación de la transferrina. En la infección/inflamación aguda o crónica se encuentran disminuidos el hierro sérico, TIBC y saturación de la transferrina. Por otra parte, una reducción del TIBC se encuentra en la enfermedad de Kwashiorkor, en el síndrome nefrósico y la enteropatía perdedora de proteínas.

La concentración sérica del receptor de transferrina se altera precozmente en la deficiencia tisular de hierro. Existen varios “kits” para su medición los que tienen valores que no son comparables. Este parámetro se eleva en la deficiencia de hierro y en la hiperplasia eritroide que es un acompañante de algunas anemias como las hemolítica, etc. La gran limitación de esta medición es su elevado costo y su gran ventaja es que no se altera en los procesos infecciosos/inflamatorios agudos o crónicos.

La concentración de ferritina sérica es directamente proporcional al contenido de hierro de los depósitos y solo se encuentra reducida en la deficiencia de hierro. Sin embargo, la ferritina sérica es un reactante de fase aguda por ello aumenta en la inflamación/infección aguda o crónica, por lo que es conveniente se mida conjuntamente algún parámetro indicador de fase aguda, siendo el más utilizado la determinación de PCR sérico. Cuando hay un aumento de la concentración de PCR Se debe elevar el punto de corte de la ferritina. Se estima que existe una depleción de los depósitos de hierro cuando la ferritina desciende bajo 12 µg/L en el niño menor de 5 años de edad y de 15 µg/L en los niños a partir de los 5 años y adultos. En sujetos con infección/inflamación una ferritina menor de 30 µg/L indica una depleción de los depósitos de hierro.

Actualmente algunos equipos automatizados, de alto costo, permiten determinar el contenido de hemoglobina de los reticulocitos, parámetro que se altera precozmente en la eritropoyesis deficiente en hierro. También esta medición es útil para el diagnóstico de la deficiencia funcional de hierro, condición en que existe un desequilibrio entre la movilización de hierro de los depósitos y las mayores demandas para la eritropoyesis cuando se estimula con eritropoyetina o estimulantes de esta hormona. También ocurre cuando existe un bloqueo de la exportación de hierro por los macrófagos del sistema reticuloendotelial, hepatocitos y enterocitos, como ocurre en la anemia de las enfermedades crónicas.

Al utilizar estos indicadores de laboratorio se debe considerar las variaciones con el desarrollo que experimentan la hemoglobina, hematocrito y volumen corpuscular medio, saturación de la transferrina, protoporfirina libre eritrocitaria, ferritina sérica y receptor de transferrina. Por otra parte, la hemoglobina presenta variaciones con el género, embarazo y en la altitud. En sujetos que viven en la altura los valores de referencia se deben incrementar a partir de los 1000 metros. También se debe realizar una corrección en los individuos fumadores.

Las pruebas de laboratorio confirmatorias se emplean para la detección de la deficiencia de hierro antes de la aparición de la anemia, para la confirmación de la etiología ferropriva especialmente en estudios poblacionales, y en el ámbito individual cuando no se obtuvo una respuesta terapéutica satisfactoria o si existen dudas de la etiología ferropriva de la anemia.

Como la sensibilidad y especificidad de los indicadores de laboratorio de la nutrición de hierro difieren considerablemente, el déficit de hierro puede detectarse más precisamente en estudios poblacionales usando una batería de exámenes. Como criterio para el diagnóstico de anemia ferropriva se exige una reducción de la hemoglobina (o hematocrito) junto con una prueba terapéutica positiva, o una reducción de la hemoglobina más uno de los otros exámenes de laboratorio alterados. Para el diagnóstico de deficiencia de hierro sin anemia se exige hemoglobina (o hematocrito) normal, más al menos dos de los otros exámenes de laboratorio alterados. Depleción de los depósitos de hierro se diagnostica cuando existe solo una ferritina sérica bajo el límite normal.

3.5. Prevención y tratamiento de la deficiencia de hierro

La deficiencia de hierro puede prevenirse mediante modificaciones de la dieta, fortificación de los alimentos o suplementación con hierro y en los países tropicales además mediante el control de parásitos intestinales hematófagos. Ninguna de estas medidas es excluyente.

En la terapia de la anemia ferropriva se utilizan compuestos de hierro de buena biodisponibilidad en una dosis diaria de 3-5 mg/kg de hierro elemental en el niño y 80 a 120 mg en el adulto, fraccionada en una a dos dosis, administradas preferentemente alejadas de las comidas, de modo de evitar las interacciones con los ligandos inhibidores presentes en la dieta. El sulfato ferroso y fumarato ferroso son los compuesto más utilizados, sin embargo están disponibles otros compuestos (sulfato ferroso de liberación gradual, hierro polimaltosado, bis glicinato ferroso, proteinsuccinilato férrico) que tienen una menor incidencia de efectos adversos de tipo gastrointestinal y que en su mayoría tienen una absorción comparable al sulfato ferroso, sin embargo su costo es más elevado. La hemoglobina se recupera habitualmente al mes del tratamiento, requiriéndose un tratamiento adicional por 2 a 3 meses para repletar los depósitos de hierro.

Actualmente están disponibles diversos preparados de hierro parenteral que presentan una muy baja incidencia de efectos adversos. Están indicados en intolerancia severa a compuestos de hierro orales, algunos casos de malabsorción (ejemplo pacientes sometidos a cirugía bariátrica), casos en que se requiere una mayor velocidad de recuperación de la hemoglobina, cuando el monto de hierro aportado por la terapia oral no es suficiente para compensar las pérdidas de este mineral y en la anemia refractaria al tratamiento con hierro (IRIDA por su sigla en inglés), patología genética autosómica recesiva, muy poco frecuente, en que hay una mutación de la proteasa TMPRSS6 que determina una producción aumentada de la hepcidina con la consiguiente malabsorción intestinal de hierro

4. LECTURAS SUGERIDAS

Arredondo M, Andrews M, Olivares M. Hierro. En: Nutrición y Salud, 2a Ed. Ruz M, Pérez F, Araya H, Atalah E, Carrasco F, Galgani J, eds. Editorial Mediterráneo, Santiago, Chile, 2016: 151-160.

Camaschella C. Iron deficiency. Blood. 2019;133(1):30-39.

Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations to prevent and control iron deficiency in the United States. MMWR Recomm Rep. 1998;47(RR-3):1-29.

Monteagudo E, Ferrer B. Deficiencia de hierro en la infancia (II). Etiología, diagnóstico, prevención y tratamiento. Acta Pediatr Esp. 2010; 68(6): 305-311.

Organización Mundial de la Salud. Concentraciones de ferritina para evaluar el estado de nutrición en hierro en las poblaciones. Sistema de Información Nutricional sobre Vitaminas y Minerales. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 2011 (OMS/NMH/NHD/MNM/11.2). http://www.who.int/vmnis/indicators/serum_ferritin_es.pdf.

Organización Mundial de la Salud. Concentraciones de hemoglobina para diagnosticar la anemia y evaluar su gravedad. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 2011 (WHO/NMH/NHD/MNM/11.1). http://www.who.int/vmnis/indicators/haemoglobin_es.pdf.

Pasricha SR, Drakesmith H. Iron Deficiency Anemia: Problems in Diagnosis and Prevention at the Population Level. Hematol Oncol Clin North Am. 2016;30(2):309-25.

Pfeiffer CM, Looker AC. Laboratory methodologies for indicators of iron status: strengths, limitations, and analytical challenges. Am J Clin Nutr. 2017;106(Suppl 6):1606S-1614S.

Pizarro F, Arredondo M, Olivares M. Hierro. En: Gil A, editor. Tratado de Nutrición 3ª Edición. Editorial Médica Panamericana, Madrid, 2017, Tomo I Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición, Capítulo 22, p. 509-526.

Powers JM, O'Brien SH. How I approach iron deficiency with and without anemia. Pediatr Blood Cancer. 2019;66(3):e27544.

Tong S, Vichinsky E. Iron deficiency: implications before anemia. Pediatr Rev. 2021 Jan;42(1):11-20.

Vogt AS, Arsiwala T, Mohsen M, Vogel M, Manolova V, Bachmann MF. On Iron Metabolism and Its Regulation. Int J Mol Sci. 2021;22(9):4591.

World Health Organization. Iron deficiency anaemia: assessment, prevention, and control. A guide for programme managers. Geneva, World Health Organization. 2001. (WHO/NHD/01.3). https://www.who.int/nutrition/publications/en/ida_assessment_prevention_control.pdf.

Capítulo

20

ANEMIAS MEGALOBLÁSTICAS

José Díaz, Blaz Lesina, Iván Palomo

Resumen

1. Introducción

2. Metabolismo de la cobalamina
2.1. Química y estructura de la cobalamina
2.2. Fuentes, requerimientos diarios y depósitos corporales
2.3. Absorción, transporte y almacenamiento
2.4. Funciones

3. Metabolismo de folatos y ácido fólico
3.1. Química y estructura de los folatos
3.2. Fuentes, requerimientos diarios y depósitos corporales
3.3. Absorción, transporte y almacenamiento
3.4. Funciones

4. Déficit y alteraciones de la absorción de vitamina B12 y ácido Fólico
4.1. Déficit de cobalamina o vitamina B12
4.2. Anemia de Addison Biermer o anemia perniciosa
4.3. Déficit de B12 y anemia megaloblástica, en situaciones específicas
4.4. Anemias megaloblásticas en la infancia por déficit de B12
4.5. Déficit de folatos

4.6. Déficit de folatos y anemia megaloblástica en situaciones específicas
4.7. Eritropoyesis megaloblástica

5. Manifestaciones clínicas

6. Diagnóstico

7. Diagnóstico diferencial

8. Lecturas sugeridas

RESUMEN

La historia de la anemia megaloblástica, es un capítulo de la química y medicina maravillosamente instructivo y gratificante. Las observaciones preliminares e incluso los auto-experimentos en el siglo XIX, establecieron las bases para una serie de investigaciones básico clínicas profundas, que convirtió una temida y mortal condición, la "anemia perniciosa" en una anemia que hoy tiene un pronóstico excelente.

Las anemias megaloblásticas por déficit de cobalamina o folatos, se clasifican como anemias carenciales junto con la anemia por deficiencia de hierro. El déficit de cobalamina, folatos o ambos, generan defectos en la síntesis de DNA, con transformación megaloblástica de precursores hematopoyéticos y anemia macrocítica-arregenerativa con o sin otras citopenias en sangre.

La causa más común de deficiencia de cobalamina, es la anemia de Addison Biermer o anemia perniciosa, enfermedad donde las células parietales de la mucosa gástrica, secretoras de factor intrínseco, son destruidas por mecanismos autoinmunes. En el déficit de vitamina B12 más allá de las alteraciones hematológicas, el paciente desarrolla síntomas neurológicos relacionados con defectos en la mielinización de nervios craneales espinales y periféricos. La anemia megaloblástica, presenta variaciones en las pruebas de laboratorio, así como en su etiología, que es necesario conocer, para establecer su diagnóstico y tratamiento.

1. INTRODUCCIÓN

Para absorber, transportar y conservar la vitamina B12 o cobalamina, se ponen en marcha distintos mecanismos celulares que aseguran su biodisponibilidad. A pesar de la mayor abundancia de folato en la dieta en relación a la cobalamina, también existen mecanismos que garantizan el aporte y almacenamiento necesario de folatos; esto es radicalmente importante, ya que, en la síntesis de DNA, folatos y cobalaminas se encuentran estrechamente relacionados.

El término anemia megaloblástica, se utiliza para describir un grupo de trastornos caracterizados por hematopoyesis megaloblástica, anemia macrocítica-arregenerativa, asociada a déficit de cobalamina, folatos o ambos; que resultan en alteraciones en la síntesis de DNA, pero que no afectan significativamente la síntesis de RNA y proteínas. Una proporción de los megaloblastos, presentan cambios aneuploides (4 N) debido a su detención en la fase G2 y M del ciclo celular que, a nivel morfológico, se expresa con signos de hematopoyesis ineficaz, asincronía madurativa núcleo-citoplasma y diseritropoyesis. En efecto, la síntesis de DNA, se encuentra alterada en todas aquellas células en rápida proliferación,

como el tejido hematopoyético, piel y epitelios, entre ellos el epitelio gastrointestinal que, al estar comprometido, puede acentuar la severidad de la anemia, al interferir con la absorción de vitaminas y de otros oligoelementos como hierro, es el caso, de la anemia megaloblástica con deficiencia de hierro. El resultado de la hematopoyesis megaloblástica, es una macrocitosis aislada, un signo precoz de megaloblastosis, que posteriormente evoluciona a anemia macrocítica y en casos avanzados del déficit, evoluciona con leucopenia y trombopenia.

El prototipo original de la anemia megaloblástica, es la anemia perniciosa o de Addison Biermer, descrita en 1849; posteriormente se demostró su relación con el déficit en la absorción de cobalamina, por disminución del factor intrínseco. En 1930 Lucy Wills, describió un nuevo factor hematopoyético, el factor Wills, que causa la “anemia perniciosa del embarazo" y la "anemia macrocítica tropical", más tarde se describió, que ambas eran consecuencia de la deficiencia de folatos. Otras causas de anemias megaloblásticas, son el déficit de estas vitaminas, por disminución de la ingesta, malabsorción o aumento de los requerimientos. Aunque en otras enfermedades pueda existir, cierto grado de diferenciación megaloblásica, como en las enfermedades mieloproliferativas, síndromes mielodisplásicos, o eritroleucemias, no se consideran conceptualmente como anemias megaloblásticas, ya que este, no es su carácter principal; de igual forma, el tratamiento y la evolución clínica son también diferentes.

2. METABOLISMO DE LA COBALAMINA

2.1. Química y estructura de la cobalamina.

La cobalamina (vitamina B12) es un complejo tipo Werner amino-complejo de cobalto (III), no deja de ser asombroso la presencia de cobalto en la estructura, dada la baja concentración de este metal en la corteza terrestre. La estructura de la cobalamina contiene una molécula de corrina que resulta de la unión asimétrica de 4 anillos pirrólicos (figura 20-1), que forman un grupo macrocíclico casi planar (núcleo corrina), en torno a un átomo central de cobalto (III) hexacoordinado. El ión cobalto se une a través de cuatro enlaces de coordinación a cada uno de los anillos de la corrina; a la estructura se agrega una cadena lateral amida, un grupo fosfato, ribosa y un pseudo nucleótido (5,6-dimetilbenzimidazol) que se une a la quinta posición de coordinación; mientras que la sexta posición axial-superior, completa la esfera de coordinación del ión, al enlazar un ligante (L) monodentado que, dependiendo del tipo de molécula, determinará el tipo de cobalamina.

La hidroxicobalamina y la cianocobalamina (vitamina B12) no son formas fisiológicas de la cobalamina; que en un proceso no del todo conocido se transforman en formas fisiológicamente activas, la metilcobalamina y adenosilcobalamina.

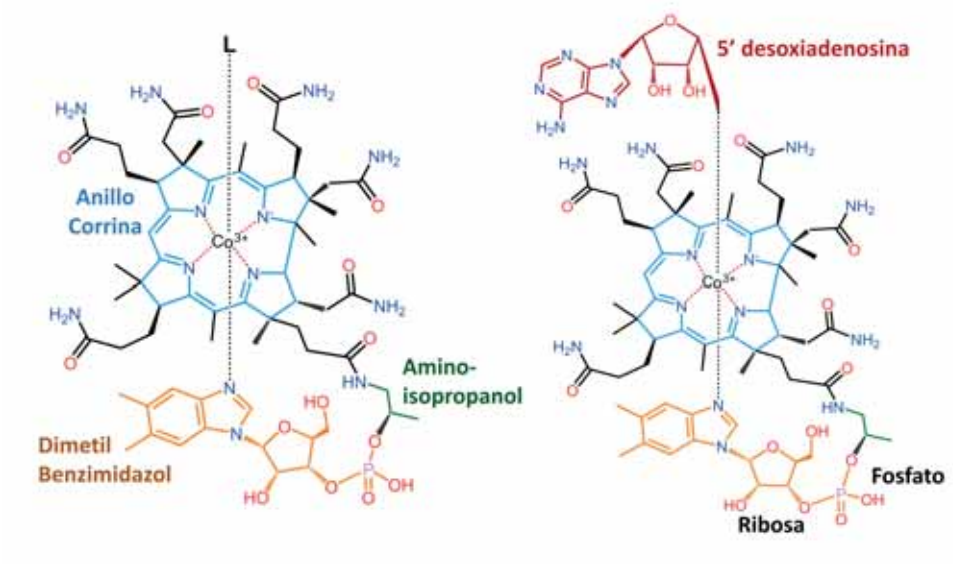


Figura 20-1. Estructura de la cobalamina. Es uno de los compuestos de coordinación naturales más complejos, en su estructura destaca la unión metal-carbono que la convierte en el primer y hasta ahora único ejemplo de compuestos organometálicos naturales. 1) La cobalamina es una vitamina hidrosoluble de 1,3-1,5 KDa., su estructura contiene un núcleo corrina, ión cobalto, grupo fosfato, ribosa y 5,6-dimetilbenzimidazol. El ión cobalto se enlaza a un ligante (L) que determina el tipo de cobalamina: grupo ciano CN- cianocobalamina, Hidroxi (-OH) hidroxicobalamina, Metil ($-CH_3$) metilcobalamina. 2) Estructura de la 5' desoxiadenosil cobalamina.

2.2. Fuentes, requerimientos diarios y depósitos corporales.

La biosíntesis de cobalamina ocurre a través de 30 reacciones secuenciales complejas en microorganismos procariontes (bacterias y hongos). Los herbívoros obtienen la cobalamina desde las plantas contaminadas con bacterias del suelo (*género Rhizobium*) productoras de cobalamina, que crecen en raíces y nódulos radiculares especialmente de legumbres. Para todos los propósitos prácticos nutricionales y médicos, los alimentos de origen vegetal donde se incluye la soya fermentada, algas marinas (nori, chlorella, espirulina) y otros productos similares, no proporcionan la concentración suficiente de cobalamina para satisfacer las necesidades diarias de un individuo, así los humanos somos totalmente dependientes de una fuente dietética de la vitamina, que puede ser adquirida a través del consumo de proteínas de origen animal, donde se encuentra acumulada, como carnes rojas, pescados, mariscos, productos lácteos y huevos. Una dieta promedio occidental no vegetariana, aporta los requerimientos diarios de cobalamina, necesarios para mantener la homeostasis y las vías metabólicas en las que participa.

La cobalamina, es estable a las temperaturas de cocción de los alimentos, pero en presencia de compuestos alcalinos y vitamina C, puede perder su actividad. La pasteurización de la leche 2-3 segundos genera una pérdida del 7 % de la cobalamina y del 30% al hervirla por 2 a 5 minutos, esto hace que la leche resulte insuficiente como fuente única de cobalamina.

Los requerimientos diarios de cobalamina, en niños de 9 a 18 años son de 1,5-2,0 µg., en adultos hombres y mujeres no embarazadas 2,4 µg. En la mujer lactante los requerimientos aumentan levemente a 2,6 µg. y en el embarazo a 2,8 µg. Raramente es necesario un incremento en las recomendaciones, pero las necesidades por cambios fisiológicos, enfermedades crónicas o subclínicas en adultos mayores, merecen ser consideradas. En este punto el 4-10% de los adultos mayores presentan deficiencia de cobalamina.

2.3. Absorción, transporte y almacenamiento

En el estómago, la cobalamina contenida en los alimentos, habitualmente en las formas de metilcobalamina o adenosilcobalamina, es liberada por digestión enzimática de la pepsina y ácido clorhídrico, secretado por las células principales y células parietales de la mucosa gástrica respectivamente. La cobalamina libre y sus derivados, se unen estequiométricamente (1:1) y con alta afinidad en medio ácido a la haptocorrina, glicoproteína de 150 kDa (también conocida como proteína-R o transcobalamina I). El complejo cobalamina-haptocorrina (CH), junto al exceso de cobalamina no unida a la haptocorrina y el FI, secretado por las células parietales del *cardias* y *fundus* gástrico, alcanzan la segunda mitad del duodeno, donde proteasas pancreáticas degradan la haptocorrina (figura 20-2).

En el duodeno la cobalamina libre, se une estequiométricamente (1:1) al FI, con alta especificidad y afinidad (figura 20-2). El FI es una glicoproteína termolábil, monomérica de 45 kDa, estructuralmente posee dos dominios (alfa y beta) entre los cuales se une la cobalamina, es estable en el rango de pH 3-9 y resistente a la degradación por proteasas. La secreción de FI es estimulada por la ingesta de alimentos, gastrina e histamina; de un modo opuesto, su secreción es inhibida por atropina, vagotomía, somatostatina y por fármacos bloqueadores del receptor H2 de la histamina, como cimetidina y omeprazol.

El complejo cobalamina-FI (CF), es estable y resistente a la digestión, por lo que transita a través del intestino delgado hasta el íleon terminal, donde se une al receptor Cubam presente en superficie apical de los enterocitos, unión que es dependiente de calcio y del pH entre 6,4-8,4 del lumen intestinal (figura 20-2). El receptor Cubam, se compone de dos proteínas cubilina y amnionless. La cubilina es una proteína periférica externa de 460 kDa., que une el complejo CF, mientras que amnionless es una proteína de transmembrana de 48 kDa. con función endocítica y que en su dominio extracelular une cubilina. El receptor Cubam y Megalina, son receptores para múltiples ligandos y se co-expresan en la membrana apical de los epitelios absortivos de enterocitos, túbulos proximales del riñón y saco vitelino.

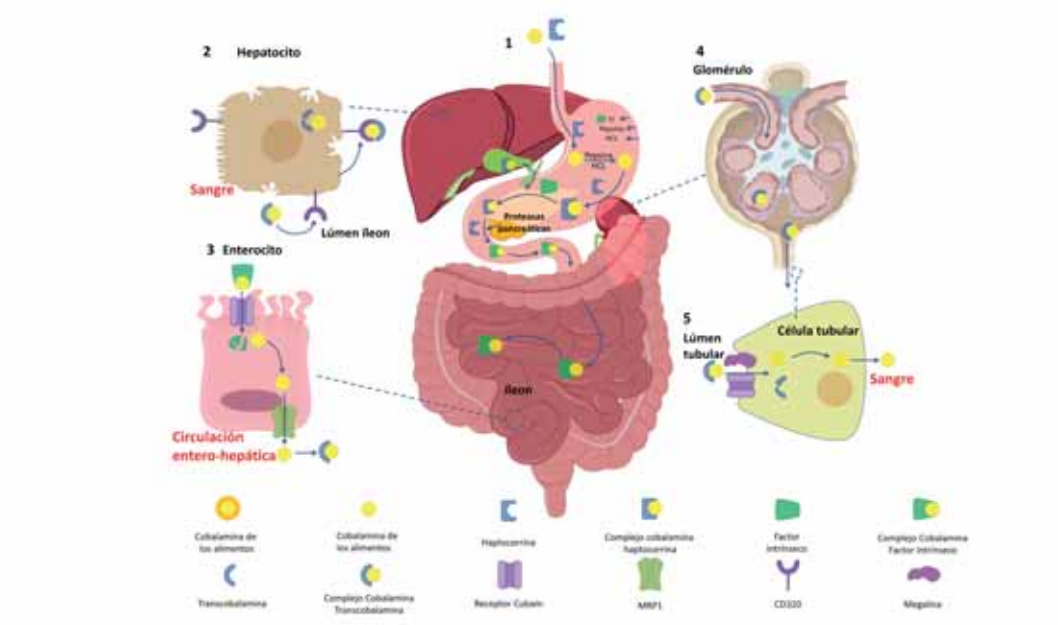


Figura 20-2. Transporte y absorción de la cobalamina. 1) La cobalamina contenida en los alimentos, es liberada en el estómago por hidrólisis ácida y pepsina; la haptocorrina salival y gástrica (resistentes a la hidrólisis) forman el complejo cobalamina-Haptocorrina (CH). En la mucosa duodenal la haptocorrina del complejo es degradada y se forma el complejo cobalamina-Factor intrínseco (CF). 2) En el íleon, el complejo CF es endocitado al unirse al receptor Cubam el que aumenta su expresión en la mucosa a medida que se acerca al colon. La cobalamina libre en el citoplasma del enterocito se moviliza a la circulación entero-hepática a través de transportadores MRP1 de la familia de las ATP-*binding cassette* (ABC) y circula a todas las células y tejidos incluida la médula ósea, como complejo cobalamina-Transcobalamina (CT). 3) En hepatocitos, células hematopoyéticas y en general en células no polarizadas, el complejo CT se une al receptor CD320 que por endocitosis y degradación lisosomal proporcionan cobalamina libre al metabolismo celular. 4-5) La reabsorción renal de cobalamina, ocurre en células epiteliales del túbulo proximal a través de receptores Cubam-Megalina, donde podrá ser almacenada en lisosomas o transportada a sangre.

En la endocitosis del complejo CF mediada por el receptor Cubam, el FI del complejo es degradado por las proteasas lisosomales, la cobalamina libre en el endosoma se moviliza al citoplasma a través del transportador lisosomal LMBD1, mientras que el receptor Cubam se recicla y retorna a la superficie apical del enterocito. La cobalamina libre en el citoplasma, se une a la proteína citosólica cobalamina C (MMACHC), que participa en la decianación de la cianocobalamina y la desalquilación de las alquilcobalaminas, posteriormente se une a la proteína citosólica cobalamina D (MMADHC) que podría definir el tráfico de la cobalamina 1) integrarse como cofactor enzimático a las reacciones del metabolismo celular o 2) seguir el tráfico exocítico hacia la circulación entero-hepática.

La cobalamina disponible en el citoplasma, se integra a las reacciones del metabolismo celular como sustrato de la proteína cobalamina E, que la transforma

en metilcobalamina, el cofactor activo de la metionina sintasa. La fracción de cobalamina que desde el citoplasma ingresa a la mitocondria, se transforma en sustrato de la proteína cobalamina B (MMAB), que la transforma en 5´desoxiadenosil cobalamina, el cofactor activo de la metilmalonil-CoA mutasa (figura 20-6).

Si el destino de la cobalamina es el tráfico exocítico, para alcanzar la circulación entero-hepática, esta lo hace por difusión simple o difusión facilitada a través de transportadores, uno de ellos y el mejor caracterizado es MRP1 (*Multidrug resistance-associated protein 1*) que se expresa en la superficie basolateral del enterocito. La cobalamina presenta un eficiente ciclo entero hepático, entre 0,5-9 µg. de la vitamina son secretados diariamente en la bilis como complejo CH, que es metabolizado y posteriormente absorbido en el intestino, de manera similar al complejo CH que provine del estómago. Se estima que aproximadamente el 70% de la cobalamina biliar es reabsorbida por este mecanismo.

En el plasma la cobalamina forma un complejo con la transcobalamina (CT) que transporta entre el 10-30% de la cobalamina a todas las células y tejidos a través de circulación sistémica. El ingreso de la cobalamina a las células, es a través de endocitosis previa unión del complejo CT receptores de la familia de lipoproteínas de baja densidad (RLDL) o CD320, presentes en células hepáticas, hematopoyéticas, pero virtualmente en todas las células y tejidos (figura 20-2). En el endosoma la transcobalamina es degradada por enzimas lisosomales y la cobalamina libre se moviliza al citoplasma para integrarse como cofactor a las reacciones enzimáticas del metabolismo celular o para seguir el tráfico exocítico hacia circulación sistémica, probablemente a través del mismo mecanismo descrito para los enterocitos.

Los mecanismos de transporte de cobalamina al sistema nervioso central a través de la barrera hematoencefálica, son en gran parte desconocidos y podrían ser relevantes como objeto de estudio, a razón de los síntomas neurológicos que provoca la deficiencia. También es importante establecer el mecanismo de transporte de cobalamina, a través de la barrera hematoplacentaria, así como el transporte desde la glándula mamaria lactante a la leche; todos ellos sistemas de transporte esenciales en las primeras etapas de la vida.

Las reservas totales de cobalaminas (5´desoxiadenosil cobalamina) varían entre 2-5 mg. en adultos, de los cuales 1 mg. se encuentra en el hígado, específicamente en lisosomas de almacenamiento de hepatocitos. Independientemente del almacenamiento y balance de cobalamina, el adulto presenta una pérdida diaria del 0,1% (1,3 µg.) de la vitamina, a través de la vía renal, fecal y por descamación celular de epitelios. Las reservas de cobalamina son suficientes para cubrir los requerimientos diarios en adultos, por un período de 3 a 4 años, después de instaurado un régimen de baja ingesta, disminución abrupta o malabsorción de cobalamina; no obstante, puede llevar más tiempo desarrollar la deficiencia, si se considera el eficiente ciclo entero hepático de la vitamina.

2.4. Funciones

En mitocondrias y microsomas las cob(III)alaminas: hidroxicobalamina y cianocobalamina, son reducidas a 5´desoxiadenosil cobalamina y metilcobalamina por reductasas dependientes de NADPH, NADH y posterior decianación de la ciano cobalamina por MMACHC. Una proporción de las cob(II)alaminas son reducidas a cob(I)alaminas (5´desoxiadenosil cobalamina) a través de una reacción de alquilación con ATP (figura 20-1).

La cobalamina participa en múltiples reacciones metabólicas en bacterias, hongos, algas; pero solo 2 de estas reacciones ocurren en humanos:

1. **Síntesis de metionina a partir de homocisteína.** La S-adenosilmetionina (SAM) es sintetizada a partir de ATP y metionina, reacción catalizada por la enzima metionina adenosil transferasa (figura 20-6, figura 20-7). El grupo metilo de la SAM es transferido a un "aceptor" para formar S-adenosil homocisteína (SAH). La SAH hidrolasa, cataliza la hidrólisis reversible de SAH a homocisteína y adenosina. En este ciclo, la metionina se reconvierte, por la transferencia de un grupo metilo desde el 5-MetilTHF a la homocisteína, reacción catalizada por la enzima metionina sintasa, que utiliza como cofactor enzimático cobalamina.

2. **Catabolismo del propionato a través de la conversión del metilmalonilCoA a succinilCoA.** Esta reacción es esencial en la reutilización mitocondrial del propionilCoA (β-oxidación de ácidos grasos), para la obtención de ATP en el ciclo de Krebs y es catalizada por la enzima metilmalonilCoA mutasa, que requiere como cofactor enzimático 5' desoxiadenosil cobalamina (figura 20-6).

3. METABOLISMO DE FOLATOS Y ÁCIDO FÓLICO

3.1. Química y estructura del Folato.

Los folatos comprenden más de 100 compuestos heterocíclicos e hidrosolubles, están compuestos por un grupo pteroil conjugado con uno o más residuos de ácido L-glutámico. El Ácido fólico (AF) o ácido pteroil glutámico (también llamado vitamina B9) es un folato sintético, oxidado y aniónico (figura 20-3), que presenta una mayor biodisponibilidad que los folatos naturales.

Los folatos metabólicamente activos (función de coenzimas), derivan de la reducción del AF por reducción de su anillo pterina, que en una primera etapa forma 7,8-dihidrofolato (DHF) y luego 5,6,7,8-Tetrahidrofolato (THF), al agregar unidades de carbono al nitrógeno 5 ó 10 del anillo pterina y por conjugación con hasta siete residuos de glutamato por enlaces γ-carboxilos.

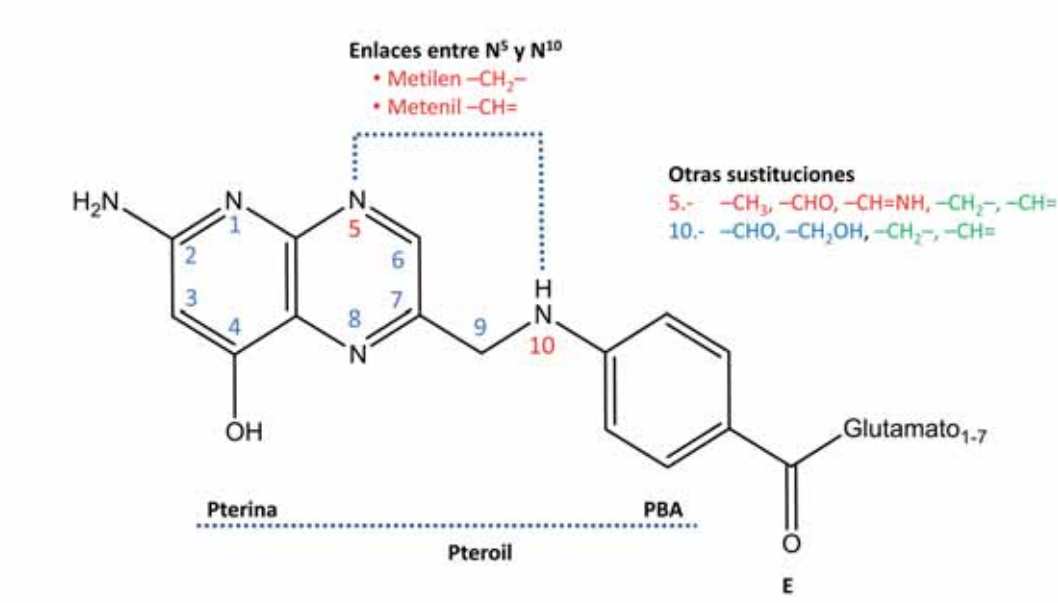


Figura 20-3. Estructura del ácido fólico. Su estructura consta de tres componentes un derivado de pteridina (pterina), que se une por un enlace metileno, al ácido p-aminobenzoico (PBA), que a su vez se une a través de un enlace amida a uno o más residuos de ácido L-glutámico (E). Los tipos de folatos más frecuentes en el organismo son los mono-, penta- y hexaglutamatos.

3.2. Fuentes, requerimientos diarios y depósitos corporales.

El folato, se encuentra en alimentos de origen animal como huevos, carnes (especialmente en hígado) y en vegetales como legumbres, cítricos y hortalizas (lechugas, espinacas, brócolis). El folato libre, representa aproximadamente 25-50% del folato de una dieta occidental, donde se incluyen los mono, di y triglutamatos, que se absorben a nivel intestinal a través del mismo mecanismo que el AF; también se encuentra el folato "total", que resulta de la suma del folato libre más los poliglutamatos. Aproximadamente el 90% del folato de los vegetales, se presenta en forma de poliglutamatos; en cambio en carnes e hígado, la mayor proporción se encuentra en la forma libre. Una fuente alternativa de folatos, es el sintetizado por bacterias intestinales en el colon, que podría contribuir a la homeostasis del folato o al menos complementar los requerimientos de folatos del colon.

El folato es una vitamina termolábil y se destruye fácilmente por compuestos oxidantes como nitratos; mientras que, el ácido ascórbico lo protege de la oxidación.

Los requerimientos diarios de AF en niños de 9 a 18 años son de 300-400 µg., en adultos hombres y mujeres no embarazadas 400 µg. En la mujer lactante los requerimientos aumentan a 500 µg. y en el embarazo a 600 µg. En el embarazo el AF es esencial en la prevención de los defectos del tubo neural (DTN) durante

el período periconcepcional. Los diferentes tipos de DTN (anencefalia, meningocele, espina bífida), son graves, muchas veces incompatibles con la vida y en su etiología están implicados tanto factores genéticos como ambientales, entre los cuales el estatus nutricional del AF, juega un rol muy importante.

3.3. Absorción, transporte y almacenamiento

En los enterocitos del duodeno y yeyuno, los folatos poliglutamatos contenidos en los alimentos, son hidrolizados a monoglutamatos, por la enzima γ-glutamil hidrolasa (GGH) presente en la superficie apical de los enterocitos, luego son transportados eficientemente al citoplasma por al menos tres transportadores (figura 20-4).

- Trasportador de folatos acoplado a transportador de protones (TF). Está expresado en una amplia variedad de células y tejidos, dentro de los cuales destacan por su alta expresión hígado y riñón.
- Transportador de folatos reducidos (TFR), presente en la superficie apical de los enterocitos, es menos eficaz que TF y posible de saturar con 200 µg. de folato. El TFR presenta una amplia distribución tisular, que incluye progenitores y precursores hematopoyéticos.
- Receptor de folato α y receptor de folato β (RF) se localiza en la superficie apical del enterocito y se encuentra unido a la membrana, a través de glicofosfatidilinositol (GPI).

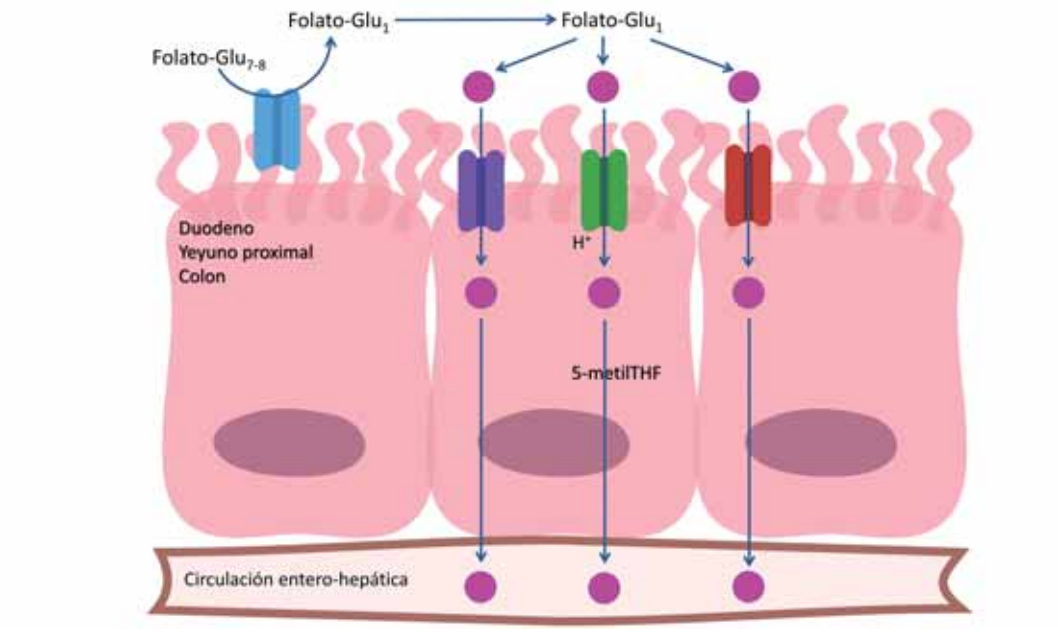


Figura 20-4. Transportadores de folatos en enterocitos y transferencia a circulación entero-hepática. GGH: γ-glutamil hidrolasa, TF: trasportador de folatos acoplado a un transportador de protones, RFα: receptor de folato alfa y TFR: transportador de folatos reducidos.

Los folatos en el citoplasma de enterocitos, rápidamente son transferidos a la circulación entero hepática (*peak* 1-2 horas), sin más modificaciones químicas, a excepción de una pequeña fracción de folatos, que es reducido y metilado a 5-MetilTHF; así los folatos en sangre, circulan unidos a albúmina o a la proteína ligante de folatos asociada a membranas, que deriva del RF escindido del GPI (figura 20-4).

La eficiencia en la absorción de folatos de la dieta, es variable entre individuos y está influenciada por diversos factores entre ellos los polimorfismos en la metilén tetrahidrofolato reductasa, el estado fisiológico del paciente (edad, embarazo, lactancia), factores biológicos (niveles de vitamina B6, B12 y homocisteína), comorbilidades (enfermedad crónica) o acceso limitado a los alimentos, por condicionantes socioeconómicas.

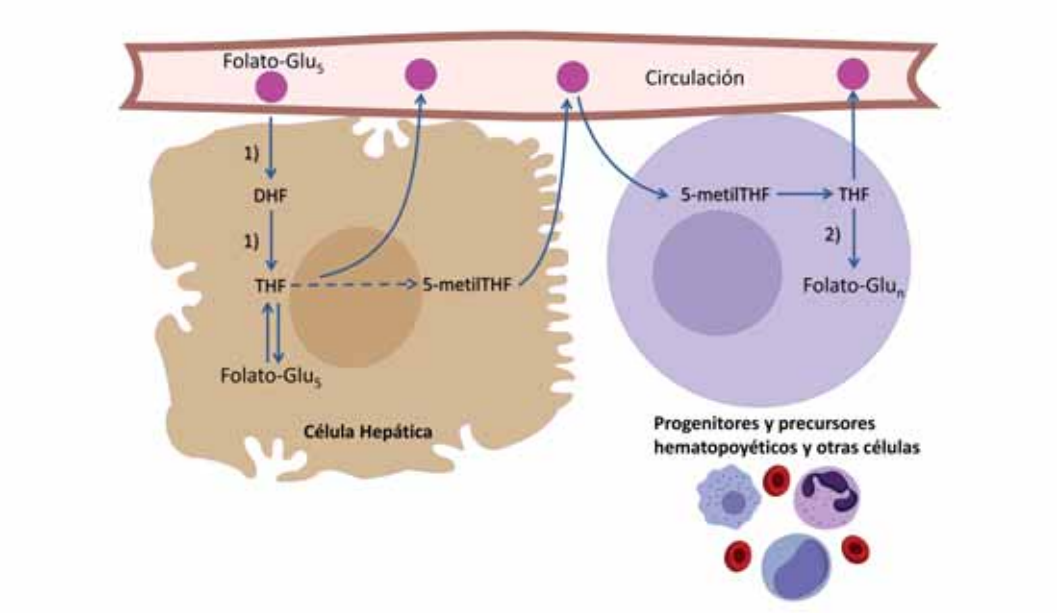


Figura 20-5. Metabolismo simplificado y almacenamiento de folatos en células hepáticas y tejido hematopoyético. 1) Dihidrofolato reductasa, 2) Folil poliglutamato sintetasa.

En circulación sistémica el 5-MetilTHF, difunde rápidamente a los tejidos; en cambio los folatos monoglutamatos son reducidos y metilados en el hígado para formar 5-MetilTHF, el que nuevamente por difusión alcanza la circulación sistémica, desde donde se distribuirá a todos los tejidos, especialmente a aquellos en rápida proliferación, como el tejido hematopoyético y epitelios. (figura 20-5).

Los folatos se almacenan en los hepatocitos como pentaglutamatos, esta reserva de 12-18 mg., es suficiente para cubrir las necesidades metabólicas de un individuo hasta por 2 meses.

3.4. Funciones

En diversas células y tejidos, entre los cuales está el tejido hepático y hematopoyético, el 5-MetilTHF es transformado a THF, al ceder el grupo metilo a la homocisteína para la síntesis de metionina. Esta reacción es catalizada por la enzima metionina sintasa, que requiere cobalamina como cofactor enzimático y es una de las reacciones principales del ciclo de metilaciones que produce S-adenosilmetionina, un donante de grupos metilos para una amplia variedad de reacciones de transmetilación (figura 20-6, figura 20-7).

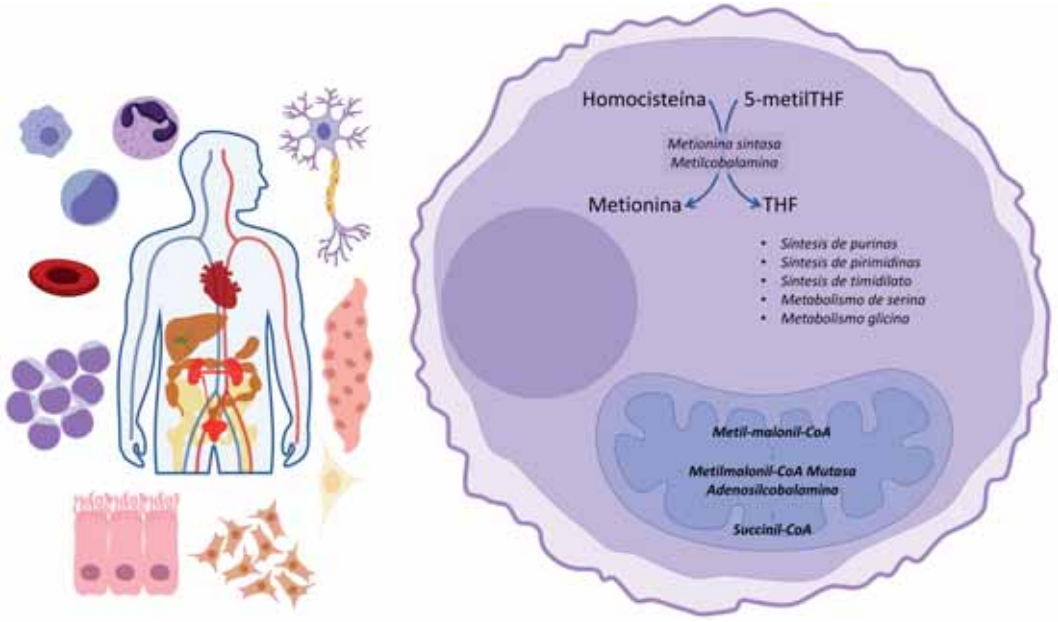


Figura 20-6. Vías metabólicas en distintas células y tejidos, en las que participan folatos y cobalamina como cofactor enzimático. Síntesis de DNA, RNA, síntesis de metionina, metabolismo de la serina y glicina.

El THF intracelular, puede difundir al plasma, para evitarlo "retención de folato" la enzima folil poliglutamato sintetasa, adiciona residuos de ácido glutámico, de esta manera el folato intracelular es "retenido", queda disponible para el metabolismo celular y solo podría difundir a circulación, si nuevamente es transformado en derivados de monoglutamatos (figura 20-5).

La función del folato en el metabolismo celular (figura 20-7), reside en su capacidad para donar y captar unidades de carbono; para ello la serina hidroximetil transferasa, transfiere el grupo metilo de la serina al THF, generando 5,10-metilénTHF, que participa en una serie de reacciones de gran importancia, entre las cuales se pueden mencionar:

- Síntesis de DNA. La enzima timidilato sintasa, transfiere el grupo metileno del 5,10-metilénTHF a la dUMP para formar dTMP un precursor del DNA.
- Síntesis de purinas. El 5,10-metilénTHF es sustrato de las enzimas: metilén tetrahidrofolato deshidrogenasa y metilén tetrahidrofolato ciclohidrolasa, sus productos 5,10-metenilTHF y 10-formilTHF respectivamente se requieren para la síntesis de purinas.
- El 5,10-metilénTHF se reduce, a través de la enzima metilén tetrahidrofolato reductasa, dando lugar a 5-MetilTHF.

Los folatos además participan en el metabolismo de aminoácidos, catabolismo de la histidina y glicina, en la interconversión glicina-serina y en la síntesis de metionina. También son parte de la síntesis de proteínas a través de reacciones de formilación de la metionina.

Finalmente, los folatos son eliminados, a través de las vías fecal, donde se encuentra el folato de la fracción alimentaria no absorbida, el proveniente de la secreción biliar no reabsorbidos y el sintetizado por las bacterias del colon. La pérdida por la vía renal corresponde a folatos no reabsorbidos, los que son metabolizados a pterina y PBA-glutámico, formados tras la ruptura del enlace C9-N10 del ácido fólico (figura 20-3).

4. DÉFICIT Y ALTERACIONES DE LA ABSORCIÓN DE VITAMINA B12 Y ÁCIDO FÓLICO

4.1. Déficit de cobalamina o vitamina B12

Las anemias megaloblásticas (AM) pueden clasificarse en tres grupos: por déficit de cobalamina, por déficit de folatos y por otros mecanismos no relacionados a déficit de vitaminas.

La deficiencia de cobalamina, se puede encontrar en cualquier nivel, del complejo proceso de absorción transporte o metabolismo celular del cual es parte (tabla 20-1), sin embargo, la deficiencia de cobalamina puramente secundaria a ingesta inadecuada, es poco frecuente y solo es posible de observar en casos de vegetarianismo estricto o veganismo. La causa más frecuente de deficiencia de cobalamina, es la anemia Addison Biermer (AAB) o anemia perniciosa.

Tabla 20-1. Clasificación fisiopatológica del déficit de cobalamina

Aporte insuficiente en la dieta
Vegetarianos estrictos y sus hijos lactantes
Lactantes de madres con anemia perniciosa
Ancianos
Malabsorción
Alteraciones gástricas
Anemia de Addison Biermer
Hipoclorhidria
Cáncer gástrico (linitis plástica)
Gastrectomía total o parcial
Gastritis crónica por *Helicobacter pylori*
Gastritis crónica por químicos
Fármacos inhibidores de la bomba de protones: biguanidas (metformina), inhibidores H2 de la histamina (cimetidina), ácido paraaminosalicílico, colchicina, colestiramina, neomicina
Alteraciones pancreáticas
Secreción inadecuada de proteasas pancreáticas
Insuficiencia pancreática exocrina
Pancreatitis crónica
Alteraciones intestinales
Resección intestinal
Linfoma intestinal
Infección por VIH
Competencia por la cobalamina: Sindrome asa ciega y *Diphyllobotrium latum*
Enfermedad inflamatoria intestinal
Síndrome de Zollinger-Ellison
Enfermedad injerto versus huésped
Esprúe tropical, esprúe no tropical, enfermedad de Crohn, esclerodermia, amiloidosis, ileítis tuberculosa y actínica
Sindrome de Imerslund-Gräesbeck (mutaciones en cubilina o AMN)
Requerimientos aumentados
Embarazo
Hipertiroidismo
Enfermedades mieloproliferativas
Mieloma múltiple
Otras
Hemodiálisis
Hipertiroidismo
Oxidación irreversible de la cobalamina por exposición a óxido nítrico
Enzimopatías hereditarias o adquiridas en las vías metabólicas de la cobalamina
Déficit hereditario o adquirido en la transcobalamina

4.2. Anemia de Addison Biermer o anemia perniciosa.

La conceptualización inicial de anemia perniciosa, se debe a Thomas Addison (Londres) y Michael Biermer (Zúrich) que, en 1849, describen una desconcertante anemia, con debilitamiento progresivo letargo y muerte (perniciosa) hoy también se conoce con el epónimo de Anemia de Addison Biermer. Es la causa más frecuente del déficit de cobalamina, afecta principalmente a pacientes adultos (edad promedio 60 años) que, en algunos casos, coexiste con signos y síntomas neurológicos. El núcleo patológico se asocia a gastritis crónica atrófica de origen autoinmune, que provoca disminución de la secreción de ácido clorhídrico, FI, pepsina y aumento de los niveles plasmáticos de gastrina.

La fisiopatología de la AAB, supone una enfermedad autoinmune (reacción de hipersensibilidad tipo III y IV) con destrucción de las células parietales gástricas del cuerpo-antro gástrico y del propio FI, en algunos casos también se encuentra afectada la absorción de hierro. La AAB se asocia a otras enfermedades autoinmunes como diabetes mellitus tipo 1, vitíligo, tiroiditis, enfermedad de Addison, lupus eritematoso e hipoparatiroidismo, entre otras. Algunos datos sugieren también una predisposición étnica y genética, relacionada con cierta frecuencia a los genotipos HLA-DRB1*03 y HLA-DRB1*04.

La gastritis crónica tipo A en la AAB, se caracteriza por atrofia epitelial, con infiltrado linfoplasmocitario y metaplasia intestinal. Aunque los estudios son contradictorios, la etiología de la lesión, se ha relacionado con la respuesta inmune del tejido MALT-gástrico frente a la infección por *Helicobacter pylori* y la similitud antigénica del patógeno, con las células parietales gástricas.

En el 80% de los casos de AAB, se detectan autoanticuerpos anti-células parietales, los que tienen un carácter de inespecíficos ya que también se presentan en otras enfermedades autoinmunes (vitíligo, agammaglobulinemia adquirida, tiroiditis autoinmune y enfermedad de Addison); hasta en el 50% de las gastritis y en un 30% de los ancianos o familiares de pacientes con AAB sanos.

Los autoanticuerpos anti-FI son más específicos, se detectan en el 50% de los pacientes con AAB. Se clasifican según su mecanismo de acción, en dos tipos. Los tipo I o bloqueadores (los más frecuentes y específicos), impiden la formación del complejo CF y los tipo II o precipitantes, inactivan el complejo CF, impidiendo su absorción en el íleon; estos últimos se presentan en el 50% de los pacientes con autoanticuerpos tipo I, siendo rara su presencia en ausencia de ellos.

4.3. Déficit de B12 y anemia megaloblástica, en situaciones específicas

Aporte insuficiente en la dieta. Es poco frecuente, pero se puede observar en veganos, vegetarianos estrictos, lactantes alimentados con leche materna de madres vegetarianas o con déficit de cobalamina.

Enfermedades o afecciones gástricas. La gastrectomía total producirá irremediablemente un déficit de cobalamina, al eliminar las células gástricas secretoras de FI. En el caso de gastrectomía subtotal, cirugía de derivación gástrica o bariátrica, la deficiencia de cobalamina se presenta entre el 12-75% de los pacientes.

Enfermedades o afecciones en el íleon terminal. La resección quirúrgica, el bypass, la enfermedad de Crohn y el esprúe tropical, impedirán la absorción de cobalamina. La pancreatitis crónica con insuficiencia exocrina, impedirá la proteólisis de la haptocorrina unida a la cobalamina, impidiendo su unión al FI. Medicamentos, se puede observar malabsorción de cobalamina, cuando se utiliza ácido paraaminosalicílico, colchicina, clorato potásico, colestiramina, neomicina, óxido nitroso, metformina o inhibidores de la bomba de protones. Competencia por la cobalamina, por excesivo crecimiento bacteriano intestinal, síndrome del asa ciega, infestación por *Diphyllobothrium latum,* diverticulosis yeyunal, fístula ileocólica, estenosis de intestino delgado y otras, producirán déficit de cobalamina. La administración por vía parenteral de cobalamina, la corrección quirúrgica de la afección intestinal, el tratamiento antibiótico o antiparasitario, podrán corregir el déficit de cobalamina.

Hiperclorhidria. Síndrome de Zollinger-Ellison, es una enfermedad poco frecuente, el paciente desarrolla uno o más tumores (gastrinomas) en la cabeza del páncreas o duodeno. El aumento de la gastrina secretada, hiperestimula la secreción ácido clorhídrico que no puede ser neutralizado por la secreción pancreática. La acidificación del contenido duodenal inactiva las proteasas pancreáticas, impidiendo la transferencia de cobalamina desde el complejo CH al FI.

4.4. Anemias megaloblásticas en la infancia por déficit de B12.

Deficiencia congénita de factor intrínseco. Enfermedad poco frecuente, autosómica recesiva, generalmente diagnosticada en los primeros dos años de vida; se caracteriza por biopsia gástrica normal, secreción de ácido clorhídrico normal, ausencia de secreción de FI y autoanticuerpos anti-FI negativos.

Enfermedad de Imerslund-Gräesbeck. Enfermedad poco frecuente, autosómica recesiva habitualmente es diagnosticada en los dos primeros años de vida; presenta malabsorción de cobalamina por mutaciones en el transportador Cubam. Los pacientes presentan anomalías renales, proteinuria y déficit neurológico de severidad variable.

Deficiencia de transcobalamina. Enfermedad autosómica recesiva, requiere diagnóstico precoz o prenatal, por el grave e irreversible daño neurológico que produce. Clínicamente también presentan vómitos, diarrea, úlceras bucales e infecciones bacterianas recurrentes. El mielograma muestra hiperplasia megaloblástica y en sangre se observa pancitopenia con niveles de folatos y cobalamina normales.

Errores congénitos en el metabolismo de la cobalamina. Es un grupo de enfermedades, provocadas por defectos en las vías metabólicas en las que participa la cobalamina. Es deseable que el diagnóstico y tratamiento sea a nivel prenatal, que evite el daño neurológico asociado. Los principales cuadros clínicos son la aciduria metilmalónica aislada, la homocistinuria aislada o la aciduria metilmalónica con homocistinuria.

4.5. Déficit de folatos.

En países desarrollados es muy raro que se produzca anemia megaloblástica, solo por déficit de folatos. Habitualmente, se asocia una situación de malabsorción, aumento de las pérdidas o mayor requerimiento como el embarazo o síndrome hemolítico crónico. Cuando ocurre afecta a ancianos o marginados sociales que llevan una dieta inadecuada. Por el contrario, en países no desarrollados es frecuente una dieta deficiente en folatos (además de hierro y otros elementos) y que contribuya a una anemia nutricional de origen multifactorial. El resto de las causas supone una proporción menor de casos, que incluye fármacos que interfieren con el metabolismo de folatos, deficiencias congénitas del metabolismo de folatos y enfermedades oncohematológicas que expresan cambios megaloblásticos (tabla 20-2).

Tabla 20-2. Clasificación fisiopatológica del déficit de folatos

Aporte insuficiente en la dieta
Ancianos, alcohólicos, enfermos crónicos, dietas especiales, métodos cocción prolongados, trastornos psiquiátricos, dieta con leche de cabra.
Inadecuada absorción
Con mucosa intestinal normal
Fármacos: anticonceptivos orales, fenobarbital, difenilhidatoína, primidona, pirimetamina, sulfasalazina e inhibidores de la bomba de protones
Hereditaria por mutaciones en el transportador de folatos (TF)
Kawashiorkor
Con alteración de la mucosa intestinal
Resección intestinal extensa
Lesiones infiltrativas benignas o malignas
Esprué tropical y no tropical
Enteritis regional
Otras patologías asociadas a malabsorción
Inadecuada utilización celular
Inhibición de la dihidrofólico reductasa: Metotrexato, pirimetamina, trimetoprima, triamterene, pentamidina y proguanil
Bloqueo de la captación y utilización celular: Difenilhidantoína

Deficiencias enzimáticas relacionadas con el metabolismo del folato
Congénitas: Formimino transferasa, dihidrofolato reductasa, MTHF transmetilasa
Adquiridas: Enfermedad hepática

Aumento de los requerimientos

Fisiológica
Embarazo, hiperemesis gravídica, lactancia
Prematuridad, infancia (etapa de crecimiento)

Patológica
Mieloptisis e infiltración medular
Enfermedades oncohematológicas
Hemólisis crónica con eritropoyesis compensatoria
Hipertiroidismo
Enfermedades cutáneas exfoliativas - psoriasis

Excreción aumentada

Hemodiálisis, insuficiencia cardiaca

Incremento de la destrucción

Fármacos que interfieren en el metabolismo de las purinas: 6-mercaptopurina, tioguanina, azatioprina y alopurinol.
Síndrome de Lesch-Nyhan

Interferencia en síntesis de pirimidinas

Antagonistas de pirimidinas: 5-fluoracilo, 5-fluorodesoxiuridina, 6-azauridina y zidovudine
Defectos enzimáticos: Aciduria orótica hereditaria

Inhibición de ribonucleótido reductasa: Arabinósido de citosina, hidroxiurea y procarbazina

Inhibición de la síntesis proteica: L-asparaginasa

Otros mecanismos

Fármacos - tóxicos: Arsénico, benceno
Anemia megaloblástica sensible a piridoxina
Anemias megaloblásticas sensibles a tiamina
Sindromes mielodisplásicos, eritroleucemia, anemias diseritropoyéticas congénitas

4.6. Déficit de folatos y anemia megaloblástica en situaciones específicas

Alcoholismo crónico. En adultos, es una de las causas frecuentes de déficit y AM. Las causas son multifactoriales, entre ellas disminución de la ingesta, de la

absorción y del almacenamiento de folatos; también se puede encontrar déficit asociado al aumento de las pérdidas por la vía renal, aumento del secuestro hepático de folatos e interferencia en ciclo entero hepático.

Inadecuada absorción. Sin considerar el alcohol y los fármacos que interfieren en la absorción de folatos, varias enfermedades que afectan al intestino delgado, pueden conducir a malabsorción de folatos. En el esprúe tropical, se produce malabsorción de folatos y también de cobalamina; en la enfermedad celíaca se produce déficit de folatos y también de hierro. Otras causas de malabsorción de folatos son la enfermedad de Crohn, linfomas intestinales, resección extensa del intestino delgado o bypass por cirugía bariátrica, esclerodermia, amiloidosis y enteropatía diabética.

Fármacos. Los medicamentos anti convulsionantes, como difenilhidantoína, primidona, fenobarbital y otros barbitúricos, producen frecuentemente déficit de folatos. También se puede presentar en el tratamiento con carbamazepina y ácido valproico. El mecanismo a través del cual se produce el déficit de folatos o AM no se conoce del todo; pero se ha sugerido, que una proporción de estos pacientes presentan además ingesta inadecuada, alteración en las enzimas del metabolismo de los folatos o defectos en su absorción. Los Fármacos que inhiben la dihidrofolato reductasa, generando déficit de folatos: metotrexato, trimetoprima, pentamidina, pirimetamina, proguanil y triamtereno. La sulfasalazina puede producir déficit de folatos al interferir con su absorción y aparentemente también con su metabolismo.

Aumento de los requerimientos

El cuidado antenatal requiere una dieta balanceada, que incluya lácteos descremados, frutas, verduras, legumbres y fuentes de proteínas; una dieta que permita la ingesta adecuada de hierro, calcio, ácido fólico y vitamina D. Aunque las necesidades de folatos, son especialmente relevantes en el tercer trimestre, se utiliza suplementación con ácido fólico 1 mg/día, desde los 3 meses antes, hasta las 12 semanas después de la concepción.

Las enfermedades cutáneas exfoliativas, como la psoriasis, producen una considerable pérdida de folatos que puede agravarse si al mismo tiempo se utiliza metotrexato. El aporte de ácido fólico oral es útil, antes de iniciar con metotrexato, para no comprometer su efectividad.

En la hematopoyesis anormal o maligna, aumentan los requerimientos de folatos. Los pacientes con hemólisis crónica-regenerativa e hiperplasia eritroide, suele acompañarse de un déficit de folatos, por aumento compensatorio de la eritropoyesis, en ella, se puede observar un “freno” de la respuesta reticulocitaria (anemia arregenerativa) que podrá evolucionar a AM, si el paciente no es suplementado con folatos. En el caso de pacientes con enfermedades mieloproliferativas u otras neoplasias malignas que desarrollan déficit de folatos, este se relaciona con el aumento de los requerimientos, de la hematopoyesis clonal.

En pediatría las causas más frecuentes del déficit de folatos son: nutricionales, el aumento de los requerimientos, sindromes de malabsorción intestinal y el uso de fármacos utilizados en esquemas de quimioterapia antineoplásica infantil.

Con baja frecuencia se presentan las alteraciones congénitas en el metabolismo del folato, que involucran el déficit de: metionina sintasa, formimino glutamato transferasa, dihidrofolato reductasa y metilén tetrahidrofolato reductasa; ellas conducen a patologías generalmente graves, de difícil diagnóstico, con sintomatología de AM y retraso mental severo.

En recién nacidos, la carencia de folatos, se produce cuando las reservas, han sido insuficientes durante el desarrollo fetal; cuando la madre del lactante es deficiente en folatos o cuando el RN recibe alimentación complementaria, con leche o alimentos con bajo aporte de folatos.

4.7. Eritropoyesis megaloblástica.

Evolutivamente el RNA aparece hace unos 400 millones de años antes que el DNA, entre otras diferencias el RNA contiene uracilo y el DNA timina. La desaminación espontánea de la citosina genera uracilo; esto significa que en la era del RNA, el uracilo podía incorporarse “peligrosamente” y de forma aleatoria al genoma; y que la transición gradual del RNA a una molécula, de estructura basada en timina (el DNA), lograría una mayor estabilidad del genoma, particularmente beneficiosa para la diversificación de la vida.

En la AM por deficiencia vitamínica, se obstaculiza la producción de desoxitimidina monofosfato (dTMP), que provoca la disminución de síntesis de DNA (figura 20-7) y bloqueo de la conversión del 5-MetilTHF en THF a través de la "trampa de folatos". Se puede resumir que la AM, es el resultado del déficit de dTMP, que produce defectos en la elongación del DNA; por la misma razón aumenta la proporción dUMP/dTMP (figura 20-7); en tal caso, el uracilo incorporado al DNA, es eliminado por la actividad exonucleasa de la uracilo DNA-glicosilasa; a pesar de ello, la disponibilidad de timina es insuficiente para reemplazar las posiciones de los uracilos removidos. El resultado es un DNA no funcional, con roturas mono y bicatenarias.

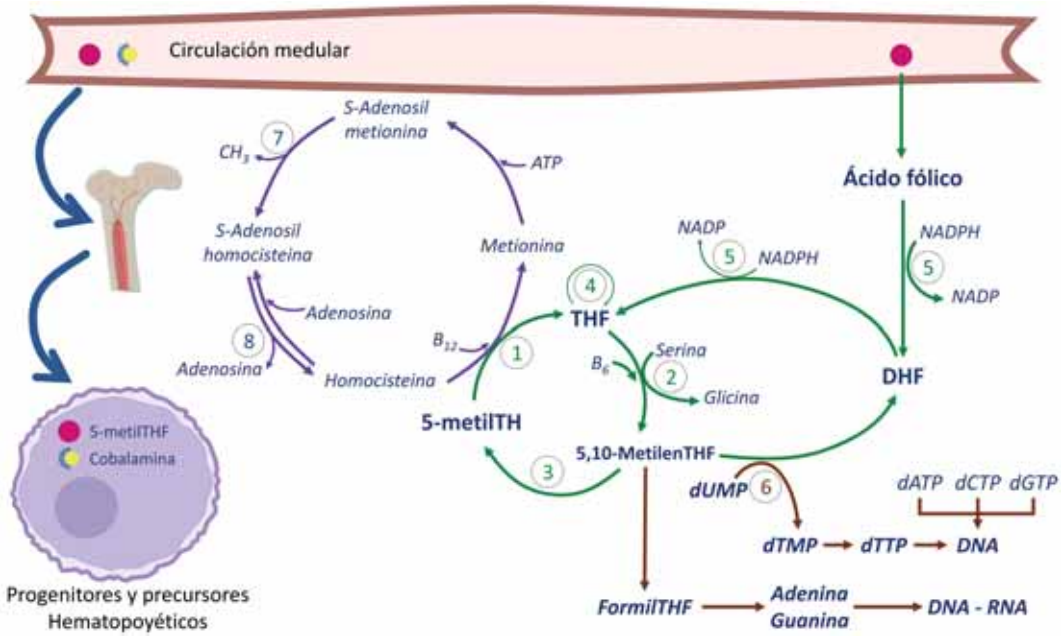


Figura 20-7. Interrelación del metabolismo del folato y cobalamina, en el ciclo de la metionina y síntesis de DNA. El folato ingresa a la célula como 5-metiltetrahidrofolato (5-MetilTHF), el grupo metilo es transferido a la homocisteína, generando metionina y tetrahidrofolato (THF), la reacción es catalizada por la metionina sintasa y requiere vitamina B12 como cofactor. Luego, el THF se convierte en 5,10-metilenTHF por transferencia de un grupo metilo a la serina. El grupo metilo del 5,10-metilenTHF se transfiere a la desoxiuridina monofosfato (dUMP), por la enzima timidilato sintasa generando desoxitimidina monofosfato (dTMP) el precursor de la desoxitimidina trifosfato (dTTP), necesario para la síntesis de DNA. El THF es regenerado por la conversión de DHF en THF a través por la enzima dihidrofolato reductasa.
1) Metionina sintasa, 2) Serina hidroximetil transferasa, 3) Metilén tetrahidrofolato reductasa, 4) Folil poliglutamato sintetasa, 5) Dihidrofolato reductasa, 6) Timidilato sintasa, 7) Metil transferasa y 8) Adenosil homocisteína hidrolasa.

El ciclo celular, cuando el nicho hematopoyético no es favorable, por aporte insuficiente de folatos/cobalamina (fase G1 y G2) o cuando la deficiencia de estas vitaminas disminuye la síntesis de DNA con daño en el mismo (al final de la fase G2), los precursores hematopoyéticos quedan arrestados, en los *checkpoint* del ciclo celular (G_{01} o G_{02}). Estos cambios se observan en el mielograma como hiperplasia medular, hemólisis extravascular (intramedular) y eritropoyesis ineficaz, que explican la anemia arregenerativa, el aumento de LDH y bilirrubina en el paciente (figura 20-8).

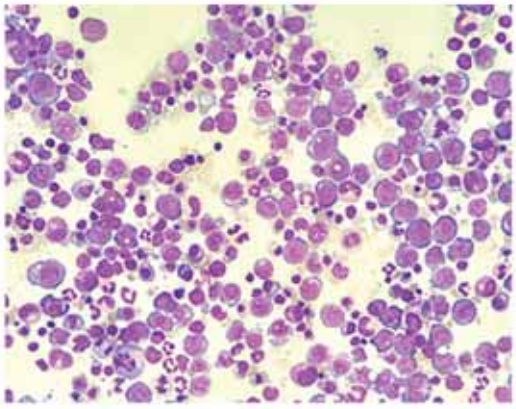


Figura 20-8. Mielograma de un paciente adulto, con anemia megaloblástica. Se observa una marcada hiperplasia de precursores eritroides y evidentes cambios megaloblásticos, en células mieloides y eritroides. La actividad mitótica es abundante, pero al mismo tiempo se observan células apoptóticas secundarias a la deficiencia en la síntesis de DNA. Las figuras 20-9, 20-10 y 20-11 muestran con mayor aumento, detalles morfológicos del mismo caso (tinción May Grünwald Giemsa 20x)

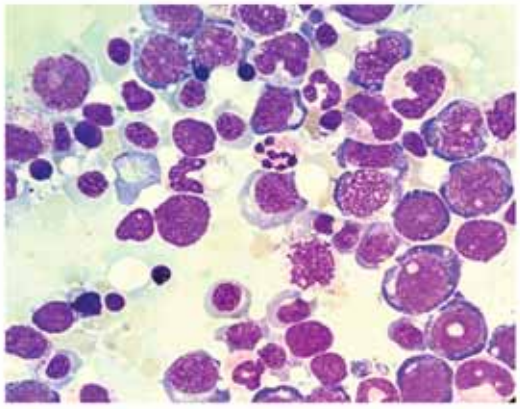


Figura 20-9. Hematopoyesis megaloblástica. Se observan todas las etapas de diferenciación de los eritroblastos con megaloblastosis.
Además de la megaloblastosis mieloide: metamielocitos y baciliformes gigantes, destaca la presencia de vacuolas, núcleos grandes y cromatina finamente dispersa o punteada.

Los precursores hematopoyéticos para una adecuada síntesis de DNA, requieren dATP, dCTP, dGTP y dTMP (figura 20-7); no obstante, solo la dTMP requiere para su síntesis cobalamina y folato; por lo tanto, la deficiencia de estas, no interfieren significativamente en la síntesis de RNA y proteínas entre ellas la hemoglobina.

Los precursores hematopoyéticos con daño en el DNA, quedan arrestados en checkpoint mitótico de la fase M (4N), incluso en una proporción mayor que los arrestados en G_{01} (2N) o G_{02} (4N). En el mielograma estos cambios se perciben como 1) asincronía madurativa núcleo-citoplasma (figura 20-9, figura 20-14), 2) incapacidad de los megaloblastos para dividirse y formar células maduras y 3) inhibición de la transición metafase-anafase, por defectos en la unión de los cromosomas al uso mitótico.

El resultado de la detención del ciclo proliferativo, en las distintas fases del ciclo celular, es la intensificación de la anemia o desarrollo de pancitopenia; La síntesis de DNA defectuosa se refleja en numerosas anomalías cromosómicas, incluidas anomalías en los telómeros, que se correlacionan con biomarcadores de inestabilidad cromosómica, disfunción mitótica y mitosis anormales (figura 20-10, figura 20-11). En el cariograma se observan alargamientos y "*puffs*" cromosómicos, asociado con roturas aleatorias, constricción exagerada del centró-

mero y alteraciones citogenéticas estructurales inespecíficas; que tienen como resultado, una perturbación severa del ciclo celular en fase G2 y M que conduce a la apoptosis de los progenitores/precursores hematopoyéticos.

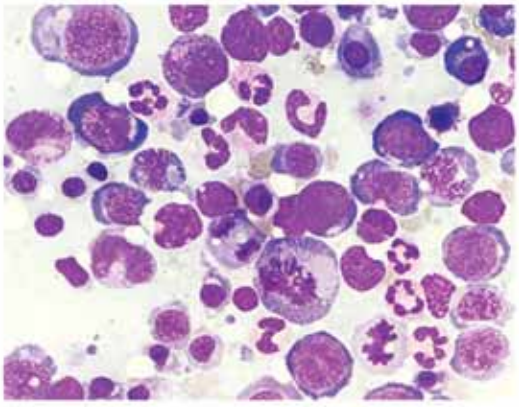


Figura 20-10. Actividad mitótica en la anemia megaloblástica. Se observan cambios megaloblásticos como juveniles y baciliformes gigantes además de un hipersegmentado con más de 5 lóbulos.
Células en mitosis: una de ellas se encuentra en anafase y otras dos exhiben metafases anormales.

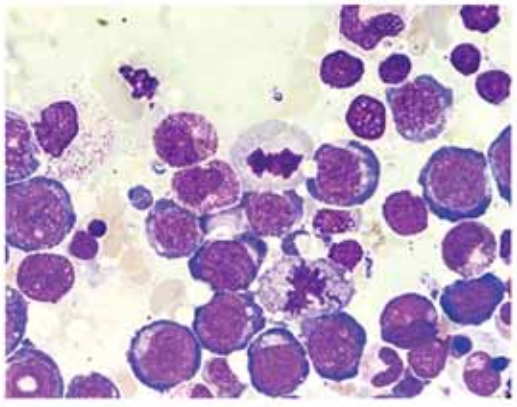


Figura 20-11. Actividad mitótica en la anemia megaloblástica. Junto a los cambios megaloblásticos característicos, se observa en la parte inferior de la figura, una célula en mitosis con desorganización de los cromosomas, uno de los cuales se encuentra libre o excluido, probablemente no unido al uso mitótico.

En la AM, para mantener la homeostasis de la masa eritroide, se induce la maduración de eritroblastos y megaloblastos, arrestados en los *checkpoint* del ciclo celular, estos al expulsar el núcleo dan origen a megalocitos, macrocitos o normocitos. Si la inducción de la maduración no es posible, se induce la apoptosis de los megaloblastos, quienes ahora exhiben cambios nucleares: lobulación, multilobulación y cariorrexis; estos hallazgos se designan bajo un concepto amplio, denominado diseritropoyesis (figura 20-12, figura 20-13). Finalmente, la cariolisis de eritroblastos y megaloblastos, da origen a los megalocitos y eventualmente a las inclusiones eritrocitarias características (figura 20-14, figura 20-15). En sangre se observa anisopoiquilocitosis megalocitos, dacriocitos eliptocitos, esquistocitos y también inclusiones eritrocitarias como cuerpos de Howell Jolly, anillos de Cabot o puntuado basófilo (figura 20-15).

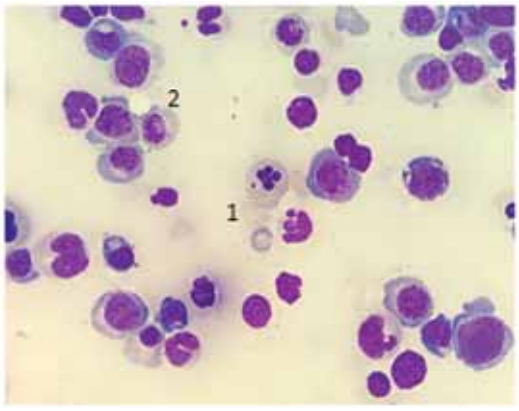


Figura 20-12. Diseritropoyesis en el mielograma de un paciente adulto con anemia megaloblástica por déficit de folatos. 1) Precursor eritroide con multilobulación y cuerpo de Howell Jolly. 2) precursor eritroide con cuerpo de Howell Jolly (tinción May Grünwald Giemsa)

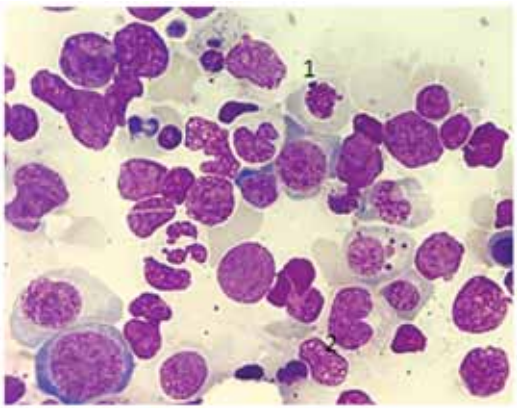


Figura 20-13. Diseritropoyesis en el mielograma de un paciente adulto con anemia perniciosa. 1) *Nuclear budding* en precursor eritroide. 2) Cariorrexis y lobulación nuclear en el precursor eritroide (tinción May Grünwald Giemsa)

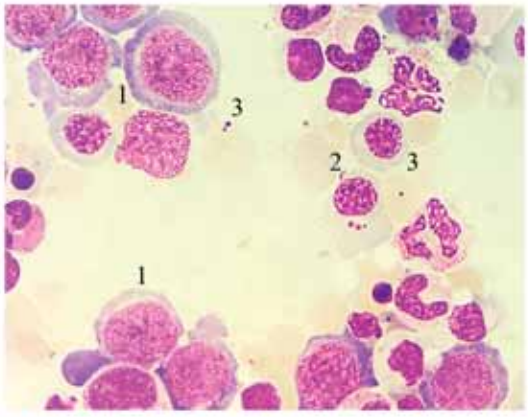


Figura 20-14. Mielograma, paciente adulto con anemia perniciosa. En los megaloblastos se observa asincronía madurativa núcleo citoplasma, con hemoglobinización normal según su etapa de diferenciación. 1) Megaloblastos con cromatina finamente dispersa/ punteada. 2) Diseritropoyesis en megaloblasto policromático y 3) Megalocitos con cuerpos de Howell Jolly. (tinción May Grünwald Giemsa)

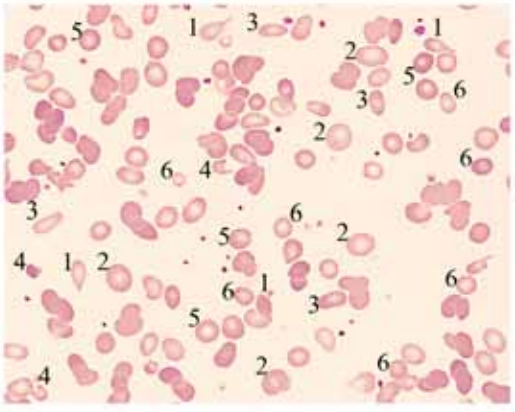


Figura 20-15. Frotis de sangre, paciente adulto con anemia megaloblástica secundaria a etilismo crónico. El hemograma revela leuconeutropenia, recuento de plaquetas normales y anemia macrocítica. El análisis del frotis sanguíneo muestra anisopoiquilocitosis con: 1) Dacriocitos, 2) Megalocitos, 3) Eliptocitos, 4) Esquistocitos *pseudo*- microangiopatía, 5) Normocitos y 6) Eritrocitos microcíticos. (tinción May Grünwald Giemsa)

5. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

En la AAB, aunque el estado general del paciente puede ser bueno, es posible observar pérdida de peso, anorexia y manifestaciones clínicas propias del síndrome anémico que es bien tolerado por el paciente e indistinguible de otras anemias; a nivel cutáneo palidez y/o leve ictericia por el discreto aumento de bilirrubina, hiperpigmentación o hipopigmentación cutánea en el caso de coexistir con vitíligo y en mucosas glositis de Hunter. Los síntomas gastrointestinales no son frecuentes, pero se expresan desde la lengua al colon, con ardor o sequedad lingual, pirosis, molestias epigástricas, sensación de saciedad precoz, plenitud postprandial y constipación. Los pacientes con AAB presentan mayor riesgo de cáncer gástrico, de hasta siete veces, superior al de la población general.

Las manifestaciones neurológicas, se presentan en el 45% de los casos al momento del diagnóstico y no necesariamente correlacionan con la anemia o la severidad de esta. Las alteraciones específicas relacionadas con el déficit son 1) Neuropatía por degeneración medular subaguda por afectación de los cordones laterales y posteriores de la médula espinal (visibles por resonancia magnética), que se expresan en alteraciones de la sensibilidad propioceptiva y vibratoria. Los pacientes presentan afectación simétrica de las extremidades, que es mayor en los miembros inferiores, característicamente pueden presentar marcha atáxica y parestesias. 2) Demencia, irritabilidad y signos extrapiramidales por afectación periférica y degeneración axonal central, que en general son reversibles al completar el tratamiento.

La lista de disfunciones neurológicas es amplia y puede incluir disfunción vesical, impotencia, hipotensión ortostática, pérdida de la agudeza visual y alteraciones en la percepción de los colores, anosmia, somnolencia, hipogeusia o ageusia. Clínicamente se puede observar signo de Romberg, Babinski, espasticidad, hiperreflexia, pérdida de la capacidad de concentración/memoria y, en algunos casos psicoanemia de Weil. Las enfermedades autoinmunes que se asocian con mayor frecuencia son tiroiditis, vitíligo y diabetes tipo 1.

En pediatría cuando el aporte de cobalamina en la dieta es insuficiente, el niño presenta retraso o regresión del desarrollo, no sonríen, presentan dificultades para alimentarse, hipotonía, letargo, irritabilidad, convulsiones, temblores, mioclono, microcefalia, movimientos coreoatetoides y en casos graves coma. El estudio de imágenes, puede revelar atrofia, desmielinización y destrucción axonal, tanto medular como encefálica (puede haber anemia). En general el tratamiento con cobalamina, produce una rápida y completa mejoría del paciente; sin embargo, cuanto más prolongado sea el período con deficiencia, más probable es la discapacidad neurológica permanente.

La AM provocada por déficit de folatos o cobalamina, son clínicamente indistinguibles entre sí, excepto por la neuropatía presente en el déficit de cobalamina y ciertos factores de riesgo, historia familiar, hábitos alimenticios o enfermedades de base, que proporcionan información relevante sobre la causa de la deficien-

cia. En general, la causa del déficit de folatos se puede encontrar en el pasado reciente del paciente (dentro de los 6 meses), por el contrario, si la causa es déficit de cobalamina, el diagnóstico puede permanecer confuso, hasta que se demuestre la deficiencia. En el pasado, cuando el diagnóstico de AM era sintomático, más del 80% de los pacientes presentaban manifestaciones neuropsiquiátricas y el 50% de los casos desarrollaba algún tipo de incapacidad.

Aunque la deficiencia de folatos en el alcohólico con deficiencia de tiamina (encefalopatía de Wernicke) y neuropatía periférica, es casi indistinguible de la deficiencia de cobalamina, el resto de las alteraciones neurológicas son exclusivas del déficit de cobalamina. No se ha demostrado inequívocamente, que la deficiencia de folato en adultos provoque alteraciones neurológicas. La coexistencia del déficit de folato con enfermedad neurológica, debe impulsar nuevas pruebas de laboratorio, que permitan descartar la deficiencia de cobalamina u otros nutrientes, que surgen de una dieta deficiente o síndromes de malabsorción.

6. DIAGNÓSTICO

Una detallada historia clínica, junto al examen físico, son esenciales para una adecuada aproximación al diagnóstico de AM. Los principales objetivos son el diagnóstico etiológico y determinar la existencia de factores de riesgo, entre estos, antecedentes familiares, hábitos alimenticios, tratamiento farmacológico u otras enfermedades de base.

Alteraciones morfológicas y cuantitativas en la anemia megaloblástica. En la deficiencia de folatos o cobalamina, el análisis morfológico y cuantitativo del hemograma, así como los hallazgos del mielograma, no difieren entre sí.

Serie eritrocitaria. Desde instaurado el déficit, hasta la aparición de anemia, se suceden varios eventos moleculares, que progresivamente aumentan el arresto de progenitores hematopoyéticos en los *checkpoint* mitóticos del ciclo celular (figura 20-8) que, en el mielograma se observan como hiperplasia medular (médula azul) y cambios en la relación mieloide/eritroide normal de 3-4:1 a 2:1 o 1:1.

El resultado de la hematopoyesis megaloblástica genera el aumento del volumen corpuscular medio (VCM > 100 fL) por presencia de macrocitosis y megalocitos (figura 20-14, figura 20-15), que representan la manifestación hematológica más temprana de megaloblastosis, aún en ausencia de anemia. Si persiste la deficiencia en el tiempo o es de larga evolución, se intensifican las alteraciones del hemograma, el paciente desarrolla anemia moderada-severa (hemoglobina < 5 g/dL) y aumentan: el VCM (> 120 fL), la hemoglobina corpuscular media (HCM > 32 pg.) y la amplitud de distribución eritrocitaria (ADE > 14,5%).

En cuanto a las características de la serie eritrocitaria, se observan: megalocitos, dacriocitos, eliptocitos, esquistocitos y esferocitos, que correlacionan muy bien con la severidad de la anemia (figura 20-15). Se ha demostrado que los eritro-

citos en la AM, presentan una reducción de la vida media, entre un 30-50%, relacionado con un aumento en la rigidez de la membrana, asociada a defectos en las proteínas que la componen.

Otras alteraciones de laboratorio, relacionadas a eritropoyesis ineficaz, son el aumento de bilirrubina, láctico deshidrogenasa-1 (en algunos casos más elevada que en otros síndromes hemolíticos) y disminución de la haptoglobina. El hierro sérico, la ferritina y el receptor soluble de la transferrina aumentan a causa de la eritropoyesis ineficaz o hemólisis intramedular.

Serie leucocitaria. La serie mieloide en la AM, es también anormal, en médula ósea se observan juveniles y baciliformes gigantes patognomónicos de megaloblastosis (figura 20-9, figura 20-10). En sangre, el recuento leucocitario, puede ser normal o presentar leucopenia, neutropenia, eosinofilia, monocitopenia y presencia de neutrófilos hipersegmentados y/o pleiocariocitos, con más de 5 lóbulos nucleares. La hipersegmentación megaloblástica, parece derivar de la omisión, durante la diferenciación de precursores neutrófilos, de una o más divisiones mitóticas; esta característica también se ha vinculado, con una manifestación hematológica temprana de megaloblastosis.

Serie plaquetaria. Los megacariocitos en la AM, pueden ser normales o presentar *pseudo*-hiperdiploidía, que se asocia con la presencia de plaquetas gigantes y trombopenia en sangre (trombopoyesis inefectiva). Se estima que la producción de plaquetas, disminuye al 10%, del potencial que tiene la masa de megacariocitos del paciente.

Es necesario mencionar, que las alteraciones celulares, moleculares y morfológicas asociadas al déficit de cobalamina o folatos, han sido tratadas en relación al tejido hematopoyético y sus componentes; sin embargo, todas las células en rápida proliferación, exhibirán cambios megaloblásticos o megaloblastosis, incluidas las células de la mucosa epitelial de todo el tracto gastrointestinal, respiratorio, urogenital, cuello uterino, vagina, útero, que pueden simular cambios neoplásicos.

Diagnóstico de anemia megaloblástica, por déficit de folatos. Considerando el síndrome megaloblástico, que se expresa con severidad variable, el criterio diagnóstico consiste en demostrar la presencia de hematopoyesis megaloblástica y disminución del folato sérico. La OMS, ha propuesto como método *gold estándar*, la cuantificación de folatos por cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas en tándem, al mismo tiempo sugiere interpretar el déficit de folatos, cuando los niveles séricos sean inferiores a 4 ng/mL (tabla 20-3). No obstante, la cuantificación de folato sérico, es una prueba con relativa baja especificidad; esto implica que pacientes con trastornos neuropsiquiátricos asociados a déficit de folatos o con AM, pueden presentar folato sérico normal.

Tabla 20-3. Interpretación de la concentración de folatos, independiente de la edad del paciente, utilizando homocisteína como indicador metabólico.

Interpretación	Folato sérico ng/mL	Folato eritrocitario‡
Normal	6-20	
Elevado	>20	
Posible deficiencia	4-5,9	
Deficiencia	<4	< 151

‡ Actualmente no se recomienda

La evaluación de folatos en las AM, idealmente requieren al mismo tiempo de la cuantificación de cobalamina, homocisteína y/o ácido metilmalónico, que permitirán distinguir entre los estados de deficiencia de cobalamina, folatos o ambos (tabla 20-4).

Diagnóstico de anemia megaloblástica, por déficit de cobalamina. Para el diagnóstico de AAB, se requiere demostrar la deficiencia de cobalamina, y otros test para determinar su causa. El test de Schilling por muchos años, fue el método gold estándar, para su diagnóstico, no obstante, desde el año 2015 a la fecha, ha disminuido su uso, hasta un punto de obsolescencia, como consecuencia de: lo oneroso de la prueba, la disponibilidad de los preparados farmacéuticos para realizarla, las dificultades en manipulación-eliminación de desechos radiactivos y la preocupación por el uso de FI de origen animal en humanos.

Las pruebas hematológicas y bioquímicas iniciales para el diagnóstico de AM, deben ser complementadas con la cuantificación la cobalamina sérica. El algoritmo diagnóstico considera la recomendación de la OMS para definir el déficit de cobalamina (< 150 pg/mL), aunque solo los valores inferiores a 100 pg/mL en pacientes con antecedentes clínicos, son inequívocos de la deficiencia (figura 20-16).

Los métodos de cuantificación de cobalamina, presentan una elevada proporción de falsos positivos y negativos, posiblemente porque 1) Solo el 20% de la cobalamina, se encuentra en plasma unida a la transcobalamina ó 2) No se ha definido un método gold estándar para su cuantificación; esto hace que la determinación de cobalamina, obligadamente esté precedida o seguida de la cuantificación de homocisteína y ácido metilmalónico, que en conjunto constituyen el primer paso para el diagnóstico de AAB (figura 20-16, Tabla 20-4).

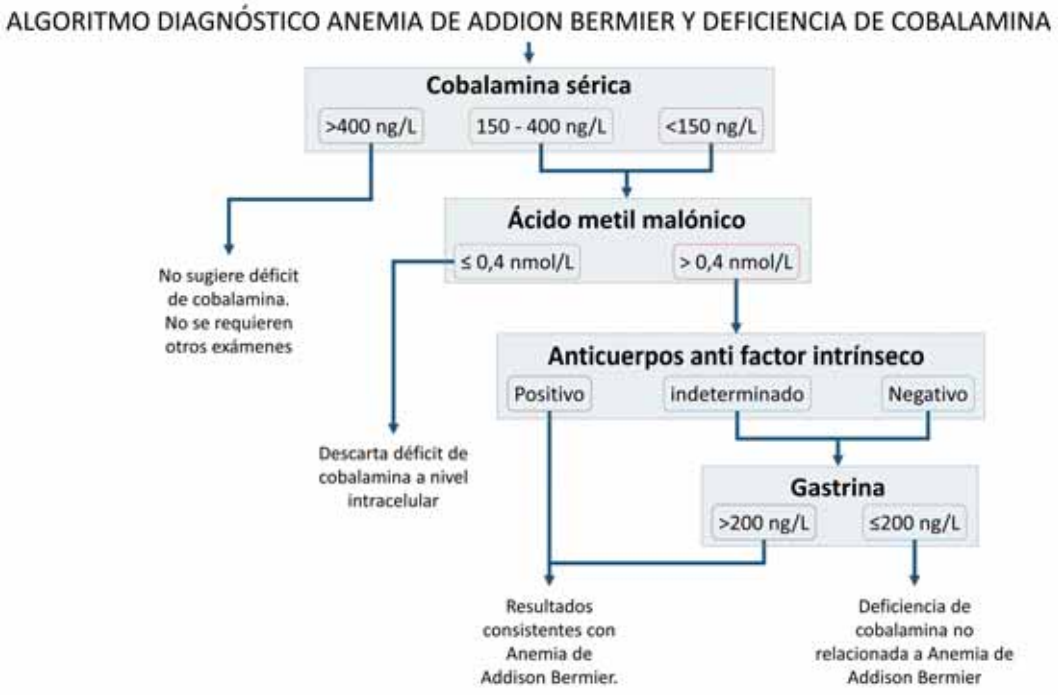

ALGORITMO DIAGNÓSTICO ANEMIA DE ADDION BERMIER Y DEFICIENCIA DE COBALAMINA
Cobalamina sérica
>400 ng/L
150 - 400 ng/L
<150 ng/L
Ácido metil malónico
≤ 0,4 nmol/L
> 0,4 nmol/L
No sugiere déficit de cobalamina. No se requieren otros exámenes
Anticuerpos anti factor intrínseco
Positivo
Indeterminado
Negativo
Descarta déficit de cobalamina a nivel intracelular
Gastrina
>200 ng/L
≤200 ng/L
Resultados consistentes con Anemia de Addison Bermier.
Deficiencia de cobalamina no relacionada a Anemia de Addison Bermier

Figura 20-16. Evaluación de la deficiencia de cobalamina. Considera la cuantificación sérica de cobalamina (V.R. 180-940 ng/L, método: ensayo de unión competitivo), anticuerpos neutralizantes anti factor intrínseco (V.R. negativo, método: inmunoensayo) y gastrina (V.R. <100 ng/L, método: inmunoquimioluminiscencia). Cuantificación de ácido metilmalónico en suero o plasma (V.R. <0,4 nmol/L, método: cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas en tándem).

En este punto se debe recordar que la homocisteína se encuentra elevada tanto en el déficit de cobalamina como de folatos, mientras que el ácido metilmalónico solo aumenta en el déficit de cobalamina y no en el de folatos (figura 20-6). Si el grupo de pruebas son consistentes con la deficiencia de cobalamina; una prueba positiva para anticuerpos bloqueadores anti factor intrínseco (ABFI), respalda firmemente la etiología de la AAB. Dado que la sensibilidad diagnóstica de la prueba ABFI, para AAB es aproximadamente de solo un 50%, una prueba ABFI indeterminada o negativa, no excluye el diagnóstico de AAB, menos aún confirma la deficiencia de cobalamina por otra etiología; en estos casos resulta útil la cuantificación de gastrina sérica (figura 20-16).

Tabla 20-4. Pruebas de laboratorio para el diagnóstico de anemias megaloblásticas

Deficiencia	Cobalamina	Folato	Ácido metilmalónico	Homocisteína
Cobalamina	D	N, A	A	A
Folatos	N	D	N	A
Mixta cobalamina/folato	D	D	A	A

N: normal, D: disminuido y A: aumentado. La cuantificación de folato eritrocitaria actualmente no se recomienda

La endoscopia digestiva alta con obtención de biopsias gástricas, se recomienda como estudio inicial para demostrar la gastritis atrófica y descartar carcinoma gástrico o tumor carcinoide relacionado con hipergastrinemia persistente (gastrina por inmunohistoquímica). Por último, una vez establecida la causa etiológica, la respuesta al tratamiento con cobalamina confirmará el diagnóstico y su fracaso haría replantear el mismo (tabla 20-5).

Tabla 20-5. Respuesta a tratamiento con la terapia correcta†

Déficit de cobalamina	
Eritropoyesis megaloblástica	Corrección a los 2 días
Anemia (Hematocrito hemoglobina)	Corrección a las 6 semanas
Macrocitosis	Corrección al primer mes
Recuento de reticulocitos	*Peak* 4-10 día (5-50%)
Hierro sérico elevado	Corrección a las 24 horas
Juveniles y baciliformes gigantes	Corrección a las 2 semanas
Leucopenia	Normalización rápida
Hipersegmentados	Corrección a las 2 semanas
Megaloblastosis en epitelios	Corrección a las 2 semanas
Gastritis crónica en la AAB	No se corrige
Repapilación lingual	Corrección 2-3 semanas
Trombopenia	Normalización rápida
Bilirrubina y LDH elevados	Corrección 1-2 semanas
Ácido metilmalónico/homocisteína	Corrección en la primera semana
Cobalamina	Los niveles séricos aumentan inmediatamente después del tratamiento. Corrección sostenida a las 2 semanas.
Síntomas gastrointestinales	Desaparecen a las 2 semanas
Síntomas neurológicos	Recuperación lenta mayor a los 6 meses. En algunos casos daño permanente

† El retardo en la respuesta hematológica sugiere déficit de hierro, infección, inflamación o neoplasia concomitante. En el déficit de folatos, la respuesta clínica a la administración de ácido fólico es completa en 1-3 días y normalización hematológica-bioquímica, similar al déficit de cobalamina.

7. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Se debe tener presente la existencia de pseudo-macrocitosis, que registran los auto analizadores hematológicos, en los casos de crioaglutininas, hiperleucocitosis, hiperglicemia o por aumento de la eritropoyesis normal en anemias hemolíticas y recuperación de la anemia post hemorragia aguda, en ambos casos el falso aumento de la VCM se relaciona con el aumento en la proporción de reticulocitos en sangre.

El diagnóstico diferencial debe incluir todas aquellas causas en que se presenta megaloblastosis medular (tabla 20-6). En este contexto, el mielograma y la biopsia de médula ósea, aunque verifican el cambio megaloblástico, no son pruebas imprescindibles para el estudio de las AM, dada la disponibilidad y acceso a pruebas de laboratorio, cada vez más rápidas y menos invasivas para el paciente. Actualmente el procedimiento de mielograma y biopsia de médula ósea, se limitan a aquellas situaciones en las que se presentan dudas en: el diagnóstico, la etiología, cuando el paciente no responde al aporte de cobalamina y/o ácido fólico o cuando se sospecha de alguna enfermedad oncohematológica (tabla 20-6).

Tabla 20-6. Causas de megaloblastosis medular

Adquiridas	Congénitas
Enfermedades mieloproliferativas	Anemias megaloblásticas congénitas
Leucemia mieloide aguda, especialmente eritroleucemia	Aciduria orótica
Sindromes mielodisplásicos	Deficiencia de transcobalamina
Quimioterapia con fármacos que interfieren con la síntesis de purinas y pirimidinas	Anemias diseritropoyéticas congénitas
Exposición crónica a benceno	Anemias sideroblásticas
Arsenicismo crónico†	
Fármacos antiretrovirales	
Fármacos que inhiben la absorción de cobalamina/folatos£	
Fármacos que disminuyen la biodisponibilidad de cobalamina/ folatos£	
Sindrome VEXAS	

† También se observa marcada cariorrexis

£ Anticonvulsivantes, antibióticos, antimaláricos, anticonceptivos y alcohol

Finalmente son también objeto de diagnóstico diferencial las siguientes causas de anemias macrocíticas no megaloblásticas, en las cuales se presenta un aumento de la VCM por aumento de la superficie eritrocitaria: hepatopatías crónicas, cirrosis, ictericia obstructiva, estomatosis hereditaria y síndrome post esplenectomía.

8. LECTURAS SUGERIDAS

Antony, A. C. (2018). Megaloblastic anemias. In Hoffman, R., Benz, E. J., Silberstein, L. E., et al. (Eds.), Hematology: Basic Principles and Practice. (7th ed., pp. 514–545). Philadelphia: Elsevier.

Balci YI, Ergin A, Karabulut A, Polat A, Dogan M, and Kucuktasci K. Serum vitamin B12 and folate concentrations and the effect of the Mediterranean diet on vulnerable populations. *Pediatr Hematol Oncol* 31: 62-67, 2014.

Carmel R. Biomarkers of cobalamin (vitamin B-12) status in the epidemiologic setting: a critical overview of context, applications, and performance characteristics of cobalamin, methylmalonic acid, and holotranscobalamin II. *Am J Clin Nutr* 94: 348S-358S, 2011.

Chanarin I. Historical review: a history of pernicious anaemia. *Br J Haematol* 111: 407-415, 2000.

Das KC, Das M, Mohanty D, Jadaon MM, Gupta A, Marouf R, and Easow SK. Megaloblastosis: from morphos to molecules. *Med Princ Pract* 14 Suppl 1: 2-14, 2005.

Grapp M, Just IA, Linnankivi T, Wolf P, Lucke T, Hausler M, Gartner J, and Steinfeld R. Molecular characterization of folate receptor 1 mutations delineates cerebral folate transport deficiency. *Brain* 135: 2022-2031, 2012.

Green R. Vitamin B12 deficiency from the perspective of a practicing hematologist. *Blood* 129: 2603-2611, 2017.

Joyce GF. The antiquity of RNA-based evolution. *Nature* 418: 214-221, 2002.

Mason JB. Folate consumption and cancer risk: a confirmation and some reassurance, but we're not out of the woods quite yet. *Am J Clin Nutr* 94: 965-966, 2011.

Nielsen MJ, Rasmussen MR, Andersen CB, Nexo E, and Moestrup SK. Vitamin B12 transport from food to the body's cells--a sophisticated, multistep pathway. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 9: 345-354, 2012.

Palmer AM, Kamynina E, Field MS, and Stover PJ. Folate rescues vitamin B12 depletion-induced inhibition of nuclear thymidylate biosynthesis and genome instability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114: E4095-E4102, 2017.

Rojas Hernández CM, and Oo TH. Advances in mechanisms, diagnosis, and treatment of pernicious anemia. *Discov Med* 19: 159-168, 2015.

Stabler SP. Vitamin B12 deficiency. *N Engl J Med* 368: 2041-2042, 2013.

Stabler SP. Clinical practice. Vitamin B12 deficiency. *N Engl J Med* 368: 149-160, 2013.

Toh BH. Diagnosis and classification of autoimmune gastritis. *Autoimmun Rev* 13: 459-462, 2014.

Capítulo

21

ANEMIA SIDEROBLÁSTICA

Rodrigo Boguen, Eduardo Fuentes, Iván Palomo

Resumen

1. **Introducción**

2. **Rol de la mitocondria en la metabolización de hierro**

3. **Etiología de las anemias sideroblásticas**

4. **Clasificación y características de las anemias sideroblásticas**
   3.1 Anemias sideroblásticas congénitas
   3.2 Anemias sideroblásticas adquiridas

5. **Diagnóstico de anemias sideroblásticas**

6. **Tratamiento**

7. **Lecturas sugeridas**

RESUMEN

Existe un grupo de patologías del metabolismo del hierro que cursan con sobrecarga de este ion, denominadas como anemias sideroblásticas (AS), las que se caracterizan por acumulación de hierro en las mitocondrias de eritroblastos. Las AS pueden ser congénitas (ASC) o adquiridas (ASA), en donde se destaca la presencia de depósitos de hierro alrededor de núcleos de eritroblastos, lo cual se conoce como sideroblastos en anillo. La metabolización del hierro mitocondrial comienza con la formación del ácido levulínico (ALA) mediante la catalización de la enzima ALA Sintasa 2. Posteriormente se metaboliza a protoporfirina IX, la cual junto al ion ferroso forman el grupo hemo, el que finalmente formará la hemoglobina. El hierro a nivel mitocondrial también es utilizado para formar los clústeres de hierro-azufre (CH-A), los que son responsables de producir distintas proteínas. La formación de proteínas mitocondriales mediadas por el ARNt y la acción de ciertos cofactores como tiamina, piridoxal fosfato (PF) y ácido α-lipoico, son necesarios para que la metabolización del hierro a nivel mitocondrial ocurra. Se han observado mutaciones en distintos pasos de formación del grupo hemo, CH-A o formación proteínas mitocondriales, las cuales se asocian con ASC. Entre las causas de ASA se destaca algunos síndromes mielodisplásicos, el alcoholismo, ingesta de ciertos fármacos y la deficiencia de cobre. El diagnóstico se realiza con la observación de sideroblastos en anillos en médula ósea. Otros hallazgos observados en sangre periférica son normocitosis, microcitosis o macrocitosis dependiendo de la causa de la AS. Las pruebas del metabolismo del hierro demuestran un estado de sobrecarga de hierro. El tratamiento puede involucrar suplementos de piridoxina, transfusiones de glóbulos rojos, quelación de hierro, agentes hipometilantes y/o estimulantes de la eritropoyesis. En algunos casos de ASA solo es necesario evitar el agente que causa la AS.

1. INTRODUCCIÓN

El hierro con la consecuente formación final de la hemoglobina, es un elemento esencial para el desarrollo eritrocitario. La deficiencia de hierro, observada como disminución del hierro transportado por transferrina e incluso con disminución de los depósitos de hierro, desencadena que los glóbulos rojos no puedan formar hemoglobina, alterando su función principal de transporte de oxígeno a los tejidos, provocando anemia. La regulación del hierro no solo es a nivel intestinal ni extracelular, ya que su regulación depende de muchos eventos intracelulares, como la formación de proteínas reguladoras de hierro, o bien el metabolismo que tiene lugar en las mitocondrias. Dentro de las mitocondrias ocurren varios procesos de regulación y metabolización del hierro dando importancia a la formación del grupo hemo, el ensamblado inicial de los clústeres de hierro-azufre o incluso la traducción de algunas proteínas.

Las alteraciones en las vías metabólicas que repercutan con el hierro a nivel mitocondrial, en el linaje eritroide, provocará la aparición de anemias sideroblásticas (AS). Las AS son un grupo heterogéneo de patologías de causas genéticas o adquiridas que se manifiestan en la médula ósea, específicamente en los precursores eritroides. Los procesos reguladores de hierro en las mitocondrias al ser alterados provocan la acumulación patológica de hierro dentro de estas, las que, al ser observadas al microscopio, tienen una distribución perinuclear, obteniendo el nombre de sideroblastos en anillos, lo cual es común para todos los tipos de anemias sideroblásticas independiente de su origen.

2. ROL DE LA MITOCONDRIA EN LA METABOLIZACIÓN DE HIERRO

La mayoría de los eventos que llevan a una AS se asocian a alteración en la metabolización del hierro dentro de la mitocondria, lo que conlleva a una acumulación de hierro dentro de este organelo celular. Es por esto que las clasificaciones o los distintos cuadros clínicos derivan de alguna de las moléculas asociadas con este proceso.

La formación del grupo hemo comienza con la internalización de glicina a la mitocondria por medio del canal "familia transportadora de soluto 25" miembro 38 (SCL25A38). La glicina dentro de la mitocondria es unida con succinil-coenzima A (succinil-CoA), proveniente del ciclo tricarboxilico, para formar ácido aminolevulínico (ALA) mediante la catalización de la enzima ALA sintasa (ALAS). Para los fines de AS, en esta catalización toma importancia la isoforma específica eritroide denominada ALAS2. La formación de ALA además requiere de piridoxal fosfato (PF) como cofactor, el cual proviene principalmente de la ingesta de alimentos. ALA sale de la mitocondria al citosol para seguir siendo metabolizada hasta llegar a formar coproporfirógeno III, el cual puede volver a entrar a la mitocondria y aquí es metabolizado por las enzimas coproporfirógeno oxidasa y luego por protoporfirógeno oxidasa para formar la finalmente protoporfirina IX (PPIX). Como paso final, la PPIX se une con ion ferroso por medio de la catalización de la enzima ferroquelasa (FECH), produciendo el grupo hemo, el cual modula la transcripción de ARNm de la globina y migra al citoplasma para unirse a las cadenas de globina, traducidas en la maquinaria intracelular, para formar la hemoglobina.

El hierro que es internalizado en la mitocondria por medio del canal mitoferrina 1 (MTFRN1), no solo es utilizado para formar el grupo hemo, ya que también se usa para formar Clusters de hierro-azufre (CH-A). Los CH-A son cofactores catalíticos y componentes estructurales de muchas proteínas mitocondriales y extramitocondriales, las cuales participan en la captación de hierro, formación del grupo hemo y almacenamiento de hierro. Entre las proteínas que requieren de los CH-A se destacan las proteínas de complejo respiratorio mitocondrial, FECH, proteína reguladora de hierro citosólico (conocida como IRP por su sigla en inglés), xantina oxidasa, ácido lipoico sintetasa (ALS) y muchas enzimas modificadoras de ADN y ARN. Las AS asociadas a la falla en CH-A se atribuyen principalmente a fallas en la etapa de transferencia de estos clústeres, como es el caso de la transferencia de 2-Fe-2S por homólogos de las proteínas del

shock térmico 70 mitocondriales (HSPA9 y HSCB) a la glutaredoxina 5 (GLRX5) mitocondrial para su posterior distribución. Las proteínas unidas a CH-A son transportadas al citosol desde la mitocondria por medio del canal Casete de unión a ATP subfamilia B miembro 7 (ABCB7).

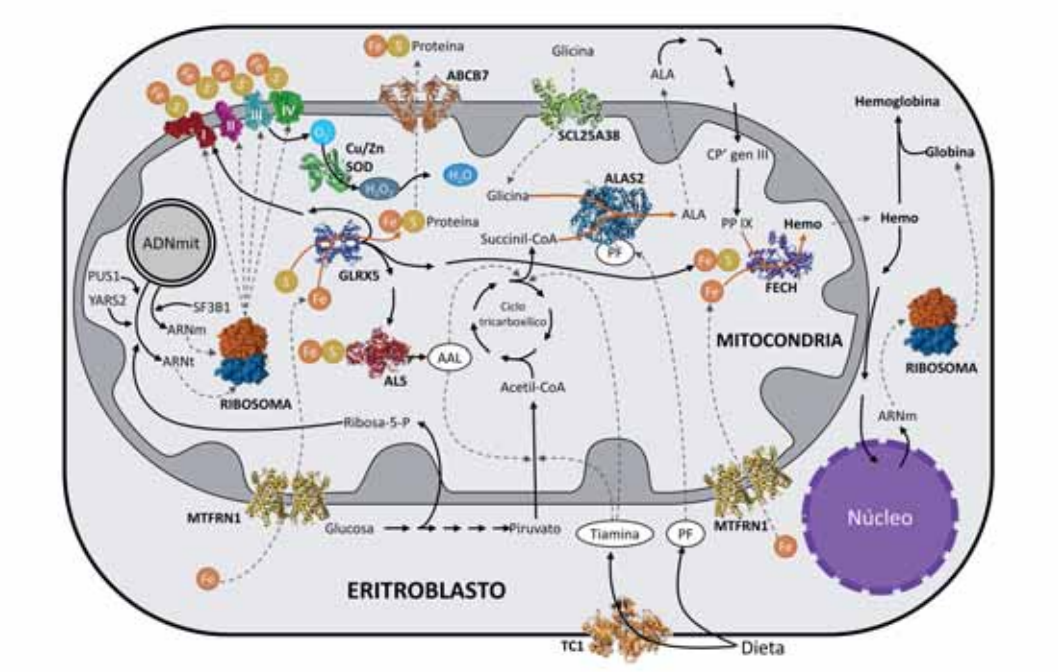


Figura 21-1. Vías metabólicas mitocondriales del hierro involucradas en AS. Los procesos metabólicos involucrados toman mayor relevancia es los estados inmaduros de los eritrocitos denominados eritroblastos. La principal vía metabólica corresponde a la formación del PP IX a partir de ALA que se forma de glicina y succinil-CoA por la enzima ALAS2 usando a PF como cofactor. El hierro que ingresa por canales MTFRN1 a la mitocondria en estado ferroso se une a la PPIX para formar finalmente al grupo hemo que a su vez migra al citoplasma para unirse a las cadenas de globina formando finalmente la hemoglobina. El hierro mitocondrial también es utilizado para formar clústeres de hierro-azufre (CH-A, en la imagen abreviado como [Fe-S]) que se unirán a distintas proteínas mitocondriales y citosólicas y para abandonar el organelo, debe usar un canal especializado denominado ABCB7. En la formación inicial de CH-A participa GLRX5. Componentes asociados al ADNmit como los ARNm y ARNt que forman distintas proteínas mitocondriales también son claves en la regulación del hierro. Los ARNt mitocondriales son metabolizados a partir de Ribosa-5-P y usando otras proteínas como PUS1 y YARS2. Los cofactores tiamina y AAL tienen una participación importante en la metabolización de la glucosa para lograr formar succinil-CoA. La enzima Cu/Zn SOD es responsable de detoxificar las especies reactivas del oxígeno producidas en la mitocondria por la CTE. Abreviaciones: AS, anemia sideroblástica; SCL25A38, familia transportadora de soluto 25 miembro 38; ALA, ácido aminolevulínico; ALAS2, ácido aminolevulínico sintasa 2; PF, piridoxal fosfato; CP' gen III, corpoporfirogeno III; PP IX, Protoporfirina; FECH, ferroquelasa; MTFRN1, mitoferrina 1; [Fe-S], clústeres de hierro-azufre; GLRX5, glutarredoxina 5; ABCB7; Casete de unión a ATP subfamilia B miembro 7; ALS, ácido lipoico sintetasa; AAL, ácido α-lipoico; TC1; Transportador de tiamina 1; CTE, cadena transportadora de electrones; Cu/Zn SOD, superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc.

Otros elementos que se pueden asociar con el metabolismo del hierro dentro de la mitocondria corresponden a la síntesis de proteínas mitocondriales, tal es el caso de la síntesis de proteínas de la cadena respiratoria. Los eventos asociados con la formación de estas proteínas están directamente relacionados con la traducción del genoma mitocondrial a través de sus propios ARNt, que son producidos a partir de ribosa-5-P, por lo que fallas en estos tipos de proteínas también se pueden asociar a AS. Además, se ha observado que el metabolismo del hierro a nivel mitocondrial puede ser alterado indirectamente por los mecanismos dependientes y reguladores de tiamina, cuya acción es ser cofactor de algunas enzimas relacionadas con el metabolismo de la glucosa que darán por resultado la formación de succinil-CoA. La formación de succinil-CoA también es mediado por el cofactor ácido α-lipoico (AAL).

Finalmente, el metabolismo del hierro mitocondrial tiene directa relación con los mecanismos antioxidantes mitocondriales, específicamente con la enzima superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc (Cu/Zn SOD), la cual detoxifica al anión superóxido producido en la cadena transportadora de electrones en peróxido de hidrógeno, el cual sigue otros pasos de conversión.

Los pasos y la interconexión de las distintas vías relacionadas con el metabolismo del hierro a nivel mitocondrial son representadas en la figura 21-1.

3. ETIOLOGÍA DE LAS ANEMIAS SIDEROBLÁSTICAS

Existen distintas clasificaciones de las AS en base a su etiología, pero la dos grandes divisiones separan a las AS de tipo congénita (ASC) o AS adquirida (ASA). El común denominador para ser catalogado como una anemia de tipo sideroblástica es que se provoque acumulación de hierro dentro de las mitocondrias de las células, sin embargo, se debe afectar principalmente las mitocondrias de los precursores eritropoyéticos para poder observar los sideroblastos en anillos, hallazgos patognomónicos de la AS. En las AS se produce una acumulación de hierro amorfo en las mitocondrias de los eritroblastos de la médula ósea, en forma de fosfato férrico e hidróxido de hierro, llamándose a estas células sideroblastos en anillo, debido a su distribución perinuclear.

Las ASC puede ser provocadas por defectos en biosíntesis de grupo hemo, biogénesis de CH-A y síntesis de proteínas mitocondriales. Los principales genes involucrados con ASC son *ALAS2, SCL25A38* y *FECH,* ya que estos participan de forma activa en la formación del grupo hemo. Si se considera que más de dos tercios del hierro corporal se encuentra unido a la hemoglobina dentro de los glóbulos rojos, no es extraño considerar que la línea eritroide es especialmente susceptible a las interrupciones en la biosíntesis del grupo hemo, en comparación con otras líneas celulares. Cualquier tipo de mutación que provoque una falla en estos genes evitará que se forme el grupo hemo, provocando que el hierro se acumule en la mitocondria. Adicionalmente la falla en la formación de los CH-A por alteraciones de los genes *GLRX5* y *ABCB7*, también provocan ASC por acumulación de hierro en la mitocondria. Además, se ha observado que deleciones en el ADN mitocondrial

(ADNmt) o mutaciones en PUS1, YARS2 o TRNT1 provocará falla en la síntesis de proteínas mitocondriales, lo cual desencadenará una ASC. Otras vías metabólicas mitocondriales pueden ser alteradas por mutaciones en el gen SCL19A2, asociado con el transporte de tiamina, provocando fenotipos de AS.

Por otra parte, las ASA pueden ser ocasionadas principalmente por mutaciones adquiridas que llegan a provocar algunos tipos de síndromes mielodisplásicos (SMD) asociados con la aparición de sideroblastos en anillos. Además, las ASA se pueden originar por la ingesta de ciertos fármacos, por alcoholismos o por deficiencia de cobre.

Independiente de la causa de la AS, el metabolismo del hierro corporal siempre se verá afectado, causada por una eritropoyesis ineficaz que provocará un estado de sobrecarga de hierro el cual influirá en las características clínicas y en el pronóstico de la AS.

Los detalles de y las distintas causas de ASC y ASA serán descritos en la sección de clasificación y características de las anemias sideroblásticas.

4. CLASIFICACIÓN Y CARACTERISTICAS DE LAS ANEMIAS SIDEROBLÁSTICAS

Desde su reconocimiento en los años 1940s y su posterior categorización como anemia en los años 1960s, los avances en genética molecular han permitido encontrar los orígenes de las AS en mutaciones de ciertos genes, las cuales se han denominado como ASC. Sin embargo, la asociación de las AS con mutaciones no solo aplica a las ASC, ya que también se han observado mutaciones responsables de gran parte de las ASA (tabla 21-1).

Una subclasificación de las ASC se puede hacer en base a la sintomatología provocada, ya que algunas, además de los síntomas hematológicos, se observan otros tipos de manifestaciones. A este tipo de ASC se les conoce como ASC tipo “sindrómicas”. A las ASC que solo tienen síntomas o manifestaciones hematológicas se les denomina ASC tipo “no sindrómicas”. Por su parte las ASA se puede subclasificar en tipo “clonal” si son secundarias a un SMD o de tipo “no clonal” si la causa es diferente.

A nivel general, en las ASC la anemia aparece generalmente en la niñez. Además, puede cursar con visceromegalia y sobrecarga de hierro. Como consecuencia de la sobrecarga de hierro se puede observar diabetes y arritmias cardíacas. La anemia puede ser altamente variable, pero los casos graves pueden presentarse como anemia microcítica hipocrómica, con presencia de siderocitos en sangre periférica. En médula ósea hay hiperplasia eritroide, acompañada de eritropoyesis inefectiva, provocada por un desequilibrio en la síntesis del grupo hemo, lo cual lleva a la formación de sideroblastos en anillo.

En las ASA, la anemia es crónica, estable, con una falla medular progresiva provocada por un agente externo o por una evolución leucémica. Esta falla medular se refleja en sangre periférica con citopenias en las tres líneas celulares.

Tabla 21-1 Clasificación de anemias sideroblásticas

Clase de AS	Gen involucrado	Sindrómica	Clonal
AS CONGÉNITA			
Defectos en la síntesis de hemo			
Ligada a X	*ALAS2*	No	NA
Deficiencia de SCL25A38	*SCL25A38*	No	NA
Protoporfiria eritropoyética	*FECH*	No	NA
Defectos en clúster Hierro-Azufre			
Deficiencia de GLRX5	*GLRX5*	No	NA
AS ligada a X con ataxia cerebelar	*ABCB7*	Si	NA
Defectos en síntesis de proteínas mitocondriales			
Síndrome médula-páncreas de Pearson	mtDNA	Si	NA
AS con acidosis láctica y miopatía	*PUS1 / YARS2*	Si	NA
AS, inmunodeficiencia, fiebre y retraso en el desarrollo	*TRNT1*	Si	NA
Multifactorial			
Anemia megaloblástica sensible a tiamina	*SCL19A2*	Si	NA
AS ADQUIRIDA			
Síndromes mielodisplásicos (SMD)			
SMD con sideroblastos en anillos y displasia de linaje simple	*SF3B1*	NA	Si
SMD con sideroblastos en anillos con displasia multilinaje			Si
SMD con sideroblastos en anillo y trombocitosis	*SF3B1 + JAK2*	NA	Si
Inducida por fármacos			
Tratamiento con Isoniacida	NA	NA	No
Tratamiento con cloranfenicol	NA	NA	No
Alcoholismo	NA	NA	No
Deficiencia de cobre			
Baja ingesta	NA	NA	No
Exceso de zinc	NA	NA	No

Abreviaciones: AS, anemia sideroblástica; NA, no aplica.

4.1. Anemias sideroblásticas congénitas

Las ASC se asocian a mutaciones que alteran distintas vías de metabolización del hierro en la mitocondria. Algunas de estas mutaciones son ligadas al cromosoma x y otras son autosómicas recesivas, pero dependiendo la vía involucrada, algunas de ellas pueden cursar solo con síntomas hematológicos y otras pueden asociar otros síntomas como neurológicos, hepáticos y/o renales.

4.1.1. Defectos en la síntesis del grupo hemo

La más común y mejor caracterizada ASC corresponde a la AS ligada a X (ASLX), que representa alrededor del 40% de los casos. ASLX se produce por una mutación sin sentido en el gen *ALAS2*, cuyo producto es responsable de los primeros pasos en la biosíntesis del grupo hemo. La enzima ALAS2 es responsable de catalizar la formación de ALA a partir de succinil-CoA y glicina, usando a PF como cofactor. Existen reportes de cerca de 100 tipos de mutaciones que causan ASLX, en donde algunas son comunes en distintos grupos familiares. Se ha reportado que casi un 5% de las familias con ASLX tienen mutaciones en el sitio de unión del factor de transcripción GATA-1. A consecuencia de las distintas mutaciones, la enzima ALAS2 tiene baja afinidad por el PF, por lo que existe una inestabilidad estructural, y el sitio catalítico es anormal, por lo tanto, no se formará ALA, el cual no saldrá al citosol, no se convertirá en coproporfirógeno III, ni se podrá formar la protoporfirina IX, es decir no habrá formación de grupo hemo. Desde el punto de vista del laboratorio, los glóbulos rojos de hombres con ASLX principalmente son microcíticos e hipocromos, por lo que incrementan la amplitud de distribución eritrocitaria. Por otra parte, se ha observado que las mujeres con ASLX tienen glóbulos rojos normales o con incrementos en el volumen corpuscular medio (VCM). Al ser ligada a X esta ASC, los principales involucrados son los hombres, sin embargo, las mujeres igual son afectadas, observando dimorfismo de sus glóbulos rojos. Los hombres comúnmente manifiestan los síntomas de ASLX antes de los 20 años, mientras que las mujeres la expresan en la adultez media o tardía.

Sorpresivamente, se ha evidenciado que de forma normal la enzima ALAS2 tiene una muy baja afinidad por glicina, por lo que las mitocondrias eritroides requieren de concentraciones altas de glicina para realizar una síntesis de hemo de forma eficiente. Debido a esa gran demanda de glicina es que la mitocondria requiere de un transportador especializado que se denomina SCL25A38, el cual es altamente expresado y de forma selectiva en eritroblastos. Es por esto que las mutaciones en SCL25A38 también causan AS, siendo estas el 15% de las ASC. La pérdida de la función el gen *SCL25A38* por mutaciones autosómicas recesivas causan un fenotipo similar a ASLX, sin embargo, estos no responden a tratamientos con piridoxina. Las características morfológicas de los glóbulos rojos de personas con mutaciones en SCL25A38 no se distinguen de varones con ASLX.

La enfermedad provocada por disminución de la actividad de la enzima FECH se conoce como Protoporfiria eritropoyética (PPE), debido a que la falla se produce en la formación final del grupo hemo, acumulando en la mitocondria a protoporfirina IX y hierro. Se han descrito más de 75 diferentes mutaciones del gen *FECH* que causan PPE. Lo más común observado es que las PPE sean causadas por mutaciones autosómicas recesivas, en las cuales los pacientes poseen una actividad del 30 % o menos en la enzima FECH. Por otra parte, se han descrito variantes ligadas a X de PPE causadas por mutaciones del gen *ALAS2*, que provocan un incremento de casi 3 veces de la actividad enzimática, lo cual se

traduce en que de todas formas se acumule protoporfirina IX en las mitocondrias. No se debe confundir las mutaciones de ALAS2 que causan PPE de las que provocan ASLX, ya que estas últimas cursan con disminución de la actividad enzimática de ALAS2. Las deficiencias marcadas de FECH se asocian con anemia leve en la mayoría de los pacientes, sin embargo, no está del todo claro que la PPE dé como resultado una AS con fenotipo en médula ósea.

4.1.2. Defectos en los clústeres de hierro-azufre

La ASLX con ataxia cerebelar (ASLX/A) es una rara forma sindrómica de ASC causada por mutaciones en el gen *ABCB7*. La proteína ABCB7 pertenece a la familia de casetes transportadoras fijadoras de ATP ubicada en la membrana mitocondrial interna, que es codificada en el cromosoma X. ABCB7 tiene un rol fundamental en la utilización de hierro en los CH-A, ya que esta biogénesis ocurre en la matriz mitocondrial, pero las proteínas que necesitan de estos clústeres se ubican en el citoplasma o en el núcleo, por lo tanto, para abandonar la mitocondria, debe usar el trasportador especializado, denominado ABCB7. La anemia se caracteriza por ser leve a moderada con microcitosis, la cual es acompañada de déficits neurológicos de retraso en el desarrollo motor y cognitivo, descoordinación e hipoplasia cerebelosa. En ASLX/A la anemia tiene menos significancia clínica que la disfunción cerebelar, ya que incluso se ha observado ataxia cerebelar en una familia debido a una mutación sin sentido de *ABCB7*, pero esta no posee ASC. Esto indica que el propio defecto en *ABCB7* no es capaz por sí solo de causar ASC, es por esto que se postula que para provocar sideroblastos en anillos se requiere que fallen las interacciones de las proteínas citosólicas dependientes del CH-A, como es el caso de IRP1. Esta última provoca la activación de elementos de respuesta a hierro (IRE) que aumentan las transcripciones de varias proteínas del metabolismo del hierro, y otras proteínas de vías mitocondriales como es el caso de ALAS2, la cual está involucrada en la formación del grupo hemo. Además de IRP1, la FECH también posee CH-A. Esto demuestra que el primer y el último paso de la formación del grupo hemo depende del estado de la formación de los CH-A.

Otra proteína responsable de la biogénesis de los CH-A es GLRX5 cuya deficiencia también causa ASC. GLRX5 es una pequeña proteína redox generalmente importante para la reducción de glutatión oxidado (GSH) y/o eliminación de la modificación de proteínas por GSH. Su nexo con AS es que GLRX5 tiene actividad de donadora de CH-A, así como sensor de estas, por lo que las AS por deficiencia de GLRX5, se deben a que en situaciones de estrés celular se produce un estado de depleción de hierro citosólico con acumulación mitocondrial en eritroblastos, lo cual provocaría la transcripción de IRPs. Los IRPs por su parte se unirán a los IREs presente en los ARNm de ALAS2 y FECH provocando su silenciamiento, evitando la formación del grupo hemo, causando el estado de AS. Esta teoría se apoya en que ALAS2 es altamente expresada en el linaje eritroide, por lo que es susceptible a la represión transcripcional causada por los IRPs. También en estos casos se ha observado un incremento de la actividad de ferroportina (Fpn) 1b, la cual es una variante que no posee un IRE, por lo cual

no es reprimida. Este incremento de actividad de Fpn, es causado por el estrés celular de la falla en la formación de CH-A, lo que provocará un estado de depleción de hierro en el citosol.

4.1.3. Defectos en la síntesis de proteínas mitocondriales

El Síndrome médula-páncreas de Pearson (SMPP) se presenta por lo general en los primeros 6 meses de vida con falla en el desarrollo, anemia y otras posibles citopenias, acidosis metabólica e insuficiencia exocrina del páncreas. También son comunes las insuficiencias renal y hepática. La causa de este síndrome se debe a alteraciones en el ADN mitocondrial (ADNmit), en donde las deleciones de 4977 pb, rearreglos o duplicados son elementos diagnósticos de este síndrome. Hasta la fecha no se ha reportado una simple región del ADNmit eliminada que se asocie con SMPP, de hecho, se ha observado que 1 o varios ARN de transferencia (ARNt) son eliminadas en casi todos los casos, por lo que el SMMP se debe a un defecto global en la traducción de proteínas mitocondriales, afectando a 1 o varias de las 22 proteínas esenciales de este proceso. La anemia de estos casos tiende a ser severa y a menudo se asocia con incrementos en la VCM. Los precursores eritroides y mieloides en la médula ósea están sorprendentemente vacuolados.

La AS con acidosis láctica y miopatía (ASALM) se caracteriza por una triada de debilidad muscular, acidosis láctica y anemia sideroblástica puede variar de normocítica a macrocítica. Las causas también se deben a defectos en la formación de ARNt y el proceso de traducción de proteínas mitocondriales. Tiene en común con el SMPP que los precursores eritroides están vacuolados y las alteraciones ultraestructurales del músculo esquelético. El fenotipo ASALM, puede ser causado por mutaciones en la enzima pseudouridina sintasa 1 (PUS1), la cual modifica postraduccionalmente los ARNt citosólicos y mitocondriales para dar estabilidad a la estructura secundaria del ARNt, y por mutaciones en la enzima tirosil ARNt sintasa mitocondrial (YARS2), la cual carga con tirosina el ARNt producido en la mitocondria. Las mutaciones en ambas enzimas provocan una disminución de la síntesis de proteínas mitocondriales con disfunción de la cadena respiratoria, sin embargo, la forma en que las mutaciones de estas enzimas provocan acumulación de hierro mitocondrial y anemia, aún no está claro.

El cuadro denominado AS, inmunodeficiencia, fiebre y retraso en el desarrollo (AIFR), se produce por mutaciones en el gen *TRNT1*, que produce la ARN polimerasa independiente de la plantilla, enzima que adiciona los nucleótidos citocina, citocina y adenina en el extremo 3' de los ARNt citosólicos y mitocondriales. El ARNt producto de esta polimerasa es base para la acción de enzimas como YARS2. En comparación con otras ASC por alteración en la síntesis de proteínas mitocondriales, la AIFR tiene una marcada microcitosis descrita entre 50 – 70 fl. Se postula que la severidad de este cuadro es que también altera a las ARNt citosólicas y también puede alterar la formación de las cadenas de globina.

4.1.4. Defecto multifactorial

El defecto multifactorial corresponde a la anemia megaloblástica sensible a tiamina (AMST). Este tipo de anemia es de tipo macrocítica y se acompaña con neutropenia variable, trombocitopenia y cambios megaloblásticos en médula ósea. La causa asociada a AMST se debe a mutaciones en el gen *SCL19A2*, el cual codifica un transportador de alta afinidad por tiamina. La anemia megaloblástica macrocítica se debe al resultado de una síntesis de ADN defectuosa por la deficiencia de tiamina. El mecanismo postulado por el cual AMST causa AS es porque existen 4 enzimas dependientes de tiamina como es el caso de transcetolasa, α-cetoglutarato deshidrogenasa, piruvato deshidrogenasa y α-cetoácido deshidrogenasa de cadena ramificada, y todas ellas tienen relación con la formación de succinil-CoA, por lo que al no existir tiamina, no se formará succinil-CoA, es decir no habrá sustrato para la enzima ALAS2, provocando así la interrupción en la formación del grupo hemo y acumulación de hierro en la mitocondria. Otra forma en que la AMST puede causar AS es porque las mismas enzimas dependientes de tiamina también participan en la formación de azúcares de ribosa, las cuales son necesarias para el metabolismo del ARNt mitocondrial.

Otro mecanismo asociado a defecto multifactorial se atribuye a la acción del ácido lipoico, también conocido como ácido α-lipoico (AAL). El AAL es cofactor para las enzimas α-cetoglutarato deshidrogenasa, piruvato deshidrogenasa y α-cetoácido deshidrogenasa de cadena ramificada, por lo que la acción de estas enzimas es dependiente de este ácido graso. El AAL se produce a partir de la enzima ALS mitocondrial, cuya acción es dependiente de los CH-A, de esta forma, también la falla en la formación de los CH-A pueden desencadenar AS por esta vía.

4.2. Anemias sideroblásticas adquiridas

Las ASA son causadas por elementos que se adquieren en algún momento de la vida. Estos elementos adquiridos también pueden involucrar mutaciones si se trata específicamente de SMD, sin embargo, otros elementos que también se asocian a ASA son la ingesta de toxina o fármacos que provocan alteración en el hierro mitocondrial.

4.2.1. Síndromes mielodisplásicos

Los Síndromes mielodisplásicos corresponden a un tipo ASA específicamente de tipo clonal, ya que se trata de un tipo de neoplasia hematológica. Dentro de la clasificación OMS de neoplasias hematológicas, se distinguen 3 categorías que conllevan a la formación de sideroblastos en anillos: SMD con sideroblastos en anillos y displasia de linaje simple (SMD-SA-DLS), SMD con sideroblastos en anillos con displasia multilinaje (SMD-SA-DML), SMD con sideroblastos en anillo y trombocitosis (generalmente abreviado solo como SMD-SA). Esta clasificación se basa en la presencia o ausencia de displasia de linaje no eritroide y también

la presencia o ausencia de trombocitosis. Se ha descrito una fuerte asociación entre presencia de SMD-SA y mutaciones en SF3B1, el cual corresponde a un componente clave en la formación el espliceosoma, cuyo rol es producir la maduración final del ARNm para formar después polipéptidos. Mutaciones heterocigotas adquiridas para SF3B1 se pueden presentar entre el 70 y 90% de los casos de SMD-SA. Al parecer las mutaciones en SF3B1 no solo provocarán la aparición de un SMD, si no que también son las responsables de formar los sideroblastos en anillos. Es común también observar otras mutaciones en conjunto al gen *SF3B1* que producen aumento de la actividad de señales de tirosina kinasa como es el caso de la mutación Val617Phe, presente aproximadamente en 60% de los casos, y otras variantes genéticas menos comunes de *JAK2, MPL* o *CALR*. También se han observado mutaciones en otros componentes del espliceosoma 3' tales como SRSF2, ZRSR2 y PRPF8, en ausencia de mutaciones en SF3B1. Sin embargo, se desconoce si esas variantes potencian la formación de SMD-SA en particular o más bien serían responsables de causar otros tipos de SMD.

Para el diagnóstico de SMD con sideroblastos en anillo se debe establecer mediante la exclusión de otras causas de AS. Los SMD-SA son afecciones raras, especialmente en niños y adultos menores de 40 años, ya que en ellos se debe considerar una base congénita y luego causa metabólica. Se debe considerar además que en mujeres con ASLX el fenotipo hematológico no se distingue de SMD-SA, por lo que en primer lugar se debe considerar el análisis del gen *ALAS2* para detectar mutaciones en ellas antes de sospechar de SMD-SA. Los puntos de corte de diagnóstico de acuerdo a la OMS corresponde a observar más de un 15% de los elementos eritroides en médula ósea con sideroblastos en anillos, por lo que si se observan menos de 15% solo corresponderían a SMD-LS o SMD-ML sin SA. En cambio, si se establece mutación del gen *SF3B1* solo se requiere observar más de 5% de sideroblastos en anillos en los elementos eritroides de médula ósea. Esto se debe a que en casos con mutaciones en SF3B1, la aparición de sideroblastos en anillos es un evento temprano en la patogenia del SMD.

4.2.2. AS inducida por fármacos

Algunas drogas que se usan para el tratamiento de la Tuberculosis como isoniazida, pirazinamida y cicloserina, son causales de AS. Estas drogas interfieren en el metabolismo de la vitamina B6 (piridoxina), disminuyendo el PF, por lo que la actividad de ALAS estará disminuida, así como también la producción del grupo hemo, provocando finalmente la acumulación de hierro en las mitocondrias de eritroblastos. La isoniazida en particular, puede inhibir la enzima piridoxal fosfoquinasa responsable de formar al PF, desencadenando los mismos efectos en la formación del grupo hemo. En estos casos se observa anemia microcítica hipocrómica que se acompaña de niveles séricos disminuidos de PF y disminución de la actividad enzimática dependiente de este cofactor.

Otro fármaco involucrado con ASA es el cloranfenicol, antibiótico usado comúnmente para tratar infecciones al tracto urinario. Su mecanismo de acción es

inhibir la síntesis proteica bacteriana fijándose en la unidad 50S del ribosoma procarionte y a su vez, se ha observado que también se puede unir a los ribosomas mitocondriales, por lo que también puede inhibir la síntesis de proteínas a este nivel. Es por esta inhibición que el cloranfenicol puede llegar a inducir anemia sideroblástica. Se ha observado que el cloranfenicol también reduce la expresión del receptor de transferrina y ferritina, favoreciendo que el hierro se acumule en las mitocondrias. En sangre periférica, se observa reticulocitopenia, anemia microcítica hipocroma y el hierro sérico está aumentado. Con la descontinuación del uso del cloranfenicol desaparecen los sideroblastos en anillos.

4.2.3. Alcoholismo

El etanol es la causa más común de ASA inducida por toxinas. La AS se produce específicamente por el abuso de alcohol. El mecanismo que genera la AS se podría deber a que el etanol inhibe la síntesis del grupo hemo, específicamente al inhibir al PF, el cual es un cofactor esencial para las enzimas ALAS2. En ausencia de PF, no existirá actividad de ALAS2. Otro mecanismo asociado con AS es que el etanol podría inhibir la síntesis de proteínas mitocondriales, lo que llevaría a la acumulación de hierro en mitocondrias provocando inhibición de la formación de colonias eritroides. Los sideroblastos en anillo se observan en un tercio de los pacientes con anemia por alcoholismo, además de que estos eritroblastos presentan vacuolas como reflejo del estrés celular.

Al tratarse de una ASA, al dejar de consumir alcohol, desaparecen los sideroblastos en anillo en un periodo de pocos días a dos semanas.

4.2.4. Deficiencia de cobre

La deficiencia de cobre es consecuencia de una ingesta inadecuada en sujetos con aumentos en sus requerimientos o bien por patologías asociadas con disminución de la absorción intestinal. El cobre es un cofactor esencial para la enzima superóxido dismutasa (SOD). La SOD en una importante enzima mitocondrial asociada con el mecanismo redox. Al haber disminución de los niveles de cobre, la actividad de SOD disminuye y se ha observado que la baja actividad de SOD provoca acumulación de hierro en las mitocondrias, posiblemente debido al estrés oxidativo que causa daño en las proteínas mitocondriales a nivel general. Además de la anemia, la deficiencia de cobre se asocia con leucopenia y trombocitopenia y otras manifestaciones neurológicas, hepáticas y/o renales. Un hallazgo común es que los eritroblastos, además de ser sideroblastos en anillo, posean vacuolas.

Otra causa de deficiencia de cobre se asocia a una ingesta excesiva de zinc. El exceso de zinc induce la expresión de la proteína de unión a metales en el intestino, denominada metalotioneína, la que atrapa al cobre y evita su absorción intestinal. Otro mecanismo de AS asociado al exceso de zinc es que, al existir mayor cantidad de este metal, aumentaría la probabilidad de que la PPIX incorpore zinc en vez de hierro, siendo este último desplazado y acumulado en siderosomas. Además, la incorporación de zinc en PPIX reduciría la funcionalidad de

la hemoglobina. A menudo las manifestaciones clínicas del exceso de zinc, son las mismas observadas en deficiencia de cobre.

5. DIAGNÓSTICO DE LAS ANEMIAS SIDEROBLÁSTICAS

Si bien existen causas adquiridas y congénitas de AS, las ASC no son detectadas al nacer y algunas veces se pueden reconocer incluso llegada la adultez como un hallazgo en chequeos médicos de rutina. Desde el punto de vista clínico los pacientes con AS se caracterizan por presentar síndrome anémico, además visceromegalia y arritmia cardiaca.

El diagnóstico común para los distintos tipos de anemias sideroblásticas consiste en realizar tinción con azul de Prusia en extendidos de médula ósea, esperando encontrar sideroblastos en anillo. Los sideroblastos en anillo corresponden a glóbulos rojos nucleados que alrededor de sus núcleos poseen gránulos sideróticos, positivos para la tinción de azul de Prusia. De acuerdo a los consensos internacionales, para que un glóbulo rojo nucleado sea considerado que posee sideroblastos en anillo debe tener alrededor de su núcleo al menos 5 gránulos sideróticos que cubran al menos un tercio de la circunferencia nuclear. Estos cuerpos sideróticos corresponden a mitocondrias con acumulación de hierro.

Desde el punto de vista del hemograma la disminución de los niveles de hemoglobina comúnmente es de moderada a severa, observado dimorfismo eritrocitario con poblaciones normocrómicas e hipocrómicas, tanto en ASC como en ASA. También se pueden observar glóbulos rojos macrocitos, así como normocitos y microcitos en los distintos casos de AS. Los glóbulos rojos con la combinación macrocítica e hipocrómica son comunes de observar en SMD-SA, en cambio los eritrocitos, microcitos e hipocromos se observan en mayoría de las ASC, mientras que las macrocitosis son comunes en ASA por alcoholismo y en la AMST. El dimorfismo eritrocitario se puede detectar al combinar los resultados del RDW y el histograma de distribución de volúmenes eritrocitarios, detectando dos poblaciones. En AS es común observar poiquilocitosis principalmente predominando la presencia de codocitos (*target cells*). Otro hallazgo que se podría encontrar son cuerpos de Pappenheimer en glóbulos rojos, los cuales son reflejo del depósito de hierro en eritrocitos. En algunos casos de AS se podría observar punteado basófilo de eritrocitos, sin embargo, este es un hallazgo más común de la intoxicación por plomo, más que en la AS. Los recuentos de leucocitos y plaquetas usualmente son normales, pero podrían cursar con leucopenia y/o trombocitopenia, sin embargo, se ha observado que un tercio de los pacientes pueden presentar trombocitosis.

La médula ósea comúnmente posee hiperplasia eritroide, pero el índice de producción reticulacitaria, obtenido del recuento de reticulocitos en sangre periférica, es menor a 2, por lo que las AS corresponderían a una anemia de tipo arregenerativa. Esta falla en la producción de glóbulos rojos se debe a defectos en la eritropoyesis por no poder utilizar de forma correcta el hierro.

Desde el punto de vista bioquímico se puede observar un incremento leve de bilirrubina sérica, disminución de haptoglobina e incremento de la actividad de lactato deshidrogenasa, como reflejo de destrucción prematura de los glóbulos rojos. Además, los estudios de hierro demuestran que las AS poseen hiperferremia, con la capacidad total de fijación de hierro a la transferrina normal o disminuida e incrementos en la saturación de la transferrina, llegando valores cercanos al 100%, junto con incrementos de la concentración de ferritina sérica. Los valores asociados a la cinética del hierro demuestran el estado de sobrecarga de hierro que poseen las personas con AS.

6. TRATAMIENTO

Como tratamiento primario para estos casos se ha usado la piridoxina. Casi la mayoría de los pacientes con ASC responden a la administración de piridoxina, lo cual se expresa primariamente en el aumento del recuento de reticulocitos, pero los signos de anemia aun no desaparecen, demostrando solo una respuesta parcial a la piridoxina. El tratamiento con piridoxina se ha visto que no es eficiente en personas con SMD-SA, sin embargo, las ASA no clonales, pueden ser revertidas completamente con su administración. En pacientes con tratamiento anti-tuberculosis, se ha observado que la suplementación con piridoxina evita la formación de sideroblastos en anillos. En el caso de pacientes con alcoholismo, la piridoxina también evita la aparición de una AS.

En caso de pacientes que no responden a piridoxina, se debe transfundir periódicamente con concentrado de glóbulos rojos, sin embargo, el riesgo de sobrecarga de hierro es mayor, por lo que, si la anemia es severa, se debe administrar terapia con quelantes de hierro como la desferroxamina. Si la anemia de la persona que requiere transfusión es moderada, se puede revertir la sobrecarga de hierro por medio de flebotomía, por ejemplo, en personas con deficiencia de GLRX5 hay una correlación entre la depleción de hierro por flebotomía con incremento de la concentración de hemoglobina. La transfusión de glóbulos rojos, debido al riesgo de sobrecarga de hierro que tiene, se debe limitar solo a personas con anemia sintomática o con niveles de hemoglobina menores a 7 g/dl. La quelación de hierro por su parte se recomienda iniciar en pacientes que requieran al menos 10 transfusiones o sus niveles de ferritina sérica superen los 1.000 µg/l.

En el caso de las ASA por deficiencia de cobre, con la sola administración de cobre, en forma de sulfato de cobre, puede revertir todas las anomalías relacionadas con AS. En el caso de otras ASA como las provocadas por fármaco o alcohol, con el simple hecho de suspender la administración del agente exógeno, la persona se recupera de la AS. En el caso de no poder suspender un fármaco, se recomienda la suplementación con piridoxina.

Para los casos de ASA de tipo clonal se recomienda el uso de agentes estimulantes de la eritropoyesis, soporte por transfusión y quelación y hierro en pacientes dependientes de transfusión. Una forma de observar la eficacia de la

terapia es que el paciente con SMD-SA requiere de menos de dos unidades de concentrados de glóbulos rojos al mes y sus niveles basales de eritropoyetina son menores a 500 UI/ml. En el caso de que el uso de estos agentes no tenga eficacia, se utilizan fármacos hipometilantes (HMA) como la 5-azacitidina y la decitabina. El uso de los HMA se debe limitar además cuando los pacientes desarrollan citopenias. Se ha demostrado que este tipo de tratamiento incrementa el recuento de eritrocitos en pacientes independientes de trasfusiones administradas.

7. LECTURAS SUGERIDAS

Fleming MD. Congenital sideroblastic anemias: iron and heme lost in mitochondrial translation. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2011;2011:525-531. doi: 10.1182/asheducation-2011.1.525.

Liu G, Guo S, Kang H, Zhang F, Hu Y, Wang L, Li M, Ru Y, Camaschella C, Han B, Nie G. Mutation spectrum in Chinese patients affected by congenital sideroblastic anemia and a search for a genotype-phenotype relationship. Haematologica 2013;98(12):e158–60. doi: 10.3324/haematol.2013.095513.

Braymer JJ, Lill R. Iron-sulfur cluster biogenesis and trafficking in mitochondria. J Biol Chem. 2017;292(31):12754-12763. doi: 10.1074/jbc.R117.787101.

Katsurada T, Kawabata H, Kawabata D, Kawahara M, Nakabo Y, Takaori-Kondo A, Yoshida Y. A Japanese family with X-linked sideroblastic anemia affecting females and manifesting as macrocytic anemia. Int J Hematol. 2016 Jun;103(6):713-7. doi: 10.1007/s12185-016-1949-7.

Ducamp S, Schneider-Yin X, de Rooij F, Clayton J, Fratz EJ Rudd A, Ostapowicz G, Varigos G, Lefebvre T, Deybach J, Gouya L, Wilson P, Ferreira GC, Minder EI, Puy H. Molecular and functional analysis of the C-terminal region of human erythroid-specific 5-aminolevulinic synthase associated with Xlinked dominant protoporphyria (XLDPP). Hum Mol Genet. 2013;22(7):1280-1288. doi: 10.1093/hmg/dds531.

Hong Ye, Suh Young Jeong, Manik C. Ghosh, Gennadiy Kovtunovych, Laura Silvestri, Danilo Ortillo, Naoya Uchida, John Tisdale, Clara Camaschella, and Tracey A. Rouault. Glutaredoxin 5 deficiency causes sideroblastic anemia by specifically impairing heme biosynthesis and depleting cytosolic iron in human erythroblasts. J Clin Invest. 2010;120(5):1749–1761. https://doi.org/10.1172/JCI40372

Hellström-Lindberg E, Cazzola M. The role of JAK2 mutations in RARS and other MDS. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2008;52-9. doi: 10.1182/asheducation-2008.1.52.

Sommerville EW, Ng YS, Alston CL, Dallabona C, Gilberti M, He L, Knowles C, Chin SL, Schaefer AM, Falkous G, Murdoch D, Longman C, de Visser M, Bindoff LA, Rawles JM, Dean JCS, Petty RK, Farrugia ME, Haack TB, Prokisch H, McFarland R, Turnbull DM, Donnini C, Taylor RW, Gorman GS. Clinical features, molecular heterogeneity, and prognostic implications in YARS2-related mitochondrial myopathy. JAMA Neurol. 2017;74(6):686-694. doi: 10.1001/jamaneurol.2016.4357.

Bottomley SS, Fleming MD. Sideroblastic anemia: diagnosis and management. Hematol Oncol Clin North Am. 2014;28(4):653-670. doi: 10.1016/j.hoc.2014.04.008.

Mangaonkar AA, Patnaik MM. Treatment of Acquired Sideroblastic Anemias. Hematol Oncol Clin North Am. 2020 Apr;34(2):401-420. doi: 10.1016/j.hoc.2019.11.002.

Kumar, A., Jazieh, A. Case report of Sideroblastic Anemia by ingestion of coins. *Am. J. Hematol*. 66: 126-129, 2001. doi: 10.1002/1096-8652(200102)66:2<126::AID-AJH1029>3.0.CO;2-J.

Capítulo

22

ANEMIA DE ENFERMEDADES CRÓNICAS

Blaz Lesina, Magdalena Sepúlveda, Eduardo Fuentes, Iván Palomo

Resumen

1. Introducción

2. Metabolismo del hierro

3. Anemia de enfermedades crónicas
- 3.1 Antecedentes generales
- 3.2 Fisiopatología
- 3.3 Cuadro clínico
- 3.4 Tratamiento

4. Anemia de enfermedades crónicas específicas
- 4.1 Infecciones
- 4.2 Enfermedades autoinmunes
- 4.3 Cáncer
- 4.4 Enfermedad renal crónica
- 4.5 Enfermedad hepática

5. Lecturas sugeridas

RESUMEN

En este capítulo, por la importancia en la fisiopatología de la Anemia de enfermedades crónicas (enfermedades autoinmunitarias, cáncer y enfermedad renal crónica) e inflamación aguda, se describe brevemente el metabolismo del hierro (Fe). El Fe es fundamental para varios procesos bioquímicos; si se altera su cantidad (disminución o aumento) o distribución, se expresa en enfermedad. Más adelante en el capítulo se profundiza en la fisiopatología de la anemia antes mencionada, una de las más frecuentes. En su fisiopatología se reconoce retención de Fe en el estroma de la médula ósea.

1. INTRODUCCIÓN

La anemia de enfermedades crónicas (AEC) es una de las más frecuentes en personas adultas. Afecta a las personas que presentan patologías que causan inflamación, como infecciones, enfermedades autoinmunes, cáncer y enfermedad renal crónica.

Este capítulo describirá brevemente el metabolismo del hierro (detalles en capítulo 8) y luego la fisiopatología de las AEC en general, como también algunos aspectos sobre diagnóstico diferencial. Luego se hace referencia a algunas particularidades en algunas patologías específicas.

2. METABOLISMO DEL HIERRO

Como antes se indicó, en el capítulo 8 se desarrolla en detalle el Metabolismo del hierro. En este capítulo, por la participación en la fisiopatología de la AEC, se describen algunos aspectos, pero muy brevemente.

En los adultos alrededor del 95% del hierro (Fe) necesario en el organismo proviene de los eritrocitos senescentes destruidos por los macrófagos esplénicos y una pequeña cantidad se absorbe. El hierro es transportado en el plasma por la proteína Transferrina (Tf; Tf-Fe), la que se une a su receptor (Receptor de Transferrina; RTf) ubicado en las células del organismo, entre ellas los eritroblastos de la médula ósea.

El metabolismo del hierro se regula a nivel intestinal alto. La absorción del Fe hemínico es mayor que la del Fe inorgánico. Algunos factores a nivel del lumen intestinal favorecen o dificultan su absorción. Por otra parte, también influye en la absorción de Fe la cantidad existente en los depósitos, la eritropoyesis y el nivel de oxigenación de la hemoglobina.

El Fe hemínico es absorbido a través del transportador HCP1 (Hem Carrier Protein 1). Durante el paso del hierro por los enterocitos a la sangre intervienen las proteínas mobilferrina y ferritina (hierro de depósito).

Varias proteínas participan en el metabolismo del hierro: Ferritina, Ferroportina, transportador de metales bivalentes (DMT1), entre otras. La expresión de dichas proteínas es regulada a nivel de traduccional por el sistema IRP (Iron Regulatory Protein)/IRE (Iron Responsive Element).

La proteína HFE, codificada por el gen de la hemocromatosis hereditaria (HH), es similar a las moléculas MHC clase I. Interactúa con el complejo RTf-Tf-Fe en la superficie de las células. Luego el complejo HFE-RTf-Tf-Fes endocitado y a pH endosomal el hierro se libera de la Tf.

La Ferroportina o proteína transportadora de metales (MTP1) tiene como función exportar hierro desde las células. La Ferroportina entrega Fe2+, a la Hefestina que lo oxida a Fe3+. Así, oxidado y en el plasma el hierro se une a la transferrina (Tf-Fe) y es transportado a los distintos tejidos.

La Hepcidina es un péptido-hormona sintetizado en el hígado y tejido adiposo. Regula el tráfico de hierro. Así, su síntesis disminuye en condiciones de deficiencia de Fe y aumenta cuando existe un exceso de hierro. En esta última situación, disminuye la absorción intestinal de hierro y promueve su almacenamiento en macrófagos y hepatocitos. En condiciones patológicas asociadas a procesos inflamatorios aumenta la síntesis de hepcidina.

3. ANEMIA DE LAS ENFERMEDADES CRÓNICAS

3.1. Antecedentes generales

La AEC es la anemia más frecuente en los pacientes hospitalizados y la segunda en ocurrencia en la población general. Se presenta en pacientes en quienes su enfermedad actual provoca una respuesta inmunitaria/inflamatoria que conduce a depleción de hierro con depósito reticuloendotelial repleto. Esta hipoferremia relativa se cree que refleja la protección activa expresada por un sistema inmunológico eficaz al privar a las células invasoras de hierro, que es importante para la proliferación tanto de células neoplásicas como patógenos, en general su severidad es proporcional a la enfermedad de base; se ha demostrado inclusive que la anemia es proporcional al número de bacterias infectantes.

Las patologías asociadas a la AEC son las infecciones agudas o crónicas, (clasicamente las crónicas como la osteomielitis) autoinmunes, en especial la artritis reumatoidea o el lupus, neoplasias y últimamente se está postulando la obesidad con un mecanismo de inflamación persistente. No se incluyen en esta definición los pacientes en los que su enfermedad o su tratamiento causan anemia directamente como se observa en algunas neoplasias malignas y el uso de citotóxicos. Debe existir un estado inflamatorio para definir que existe una AEC por este motivo algunos autores la llaman anemia inflamatoria.

La AEC es primariamente debida a una alteración del metabolismo del hierro en que destaca la coexistencia de una hipoferremia con depósitos de hierro normal o aumentado. La anemia suele ser normocítica y normocrómica.

3.2. Fisiopatología

La patogenia de la AEC es multifactorial: (i) Alteración del metabolismo del hierro, (ii) Eritropoyesis reducida, (iii) Respuesta disminuida a la eritropoyetina y (iv) Reducción de la sobrevida de los eritrocitos.

Alteración del metabolismo del hierro

La patogenia de la AEC es variada y depende de la enfermedad de base, sin embargo la alteración en el metabolismo del hierro parece ser el mecanismo predominante de la anemia

La invasión microbiana, las neoplasias y los trastornos autoinmunes causan activación del sistema inmune, los lipopolisacáridos bacterianos e IL-6 inducen a las células hepáticas a liberar hepcidina que mejora la descomposición de la ferroportina, lo que lleva al bloqueo de la transferencia de hierro duodenal. Ambas moléculas también regulan positivamente la expresión de DMT-1 que aumenta la internalización de hierro por los macrófagos, se inhibe además la expresión de ferroportina que deprime la entrega de hierro del macrófago a los precursores eritroides en crecimiento, por lo tanto se produce una disminución, tanto en la absorción de hierro como en la disponibilidad de hierro para la formación de eritrocitos, además de un atrapamiento del hierro dentro de los macrófagos.

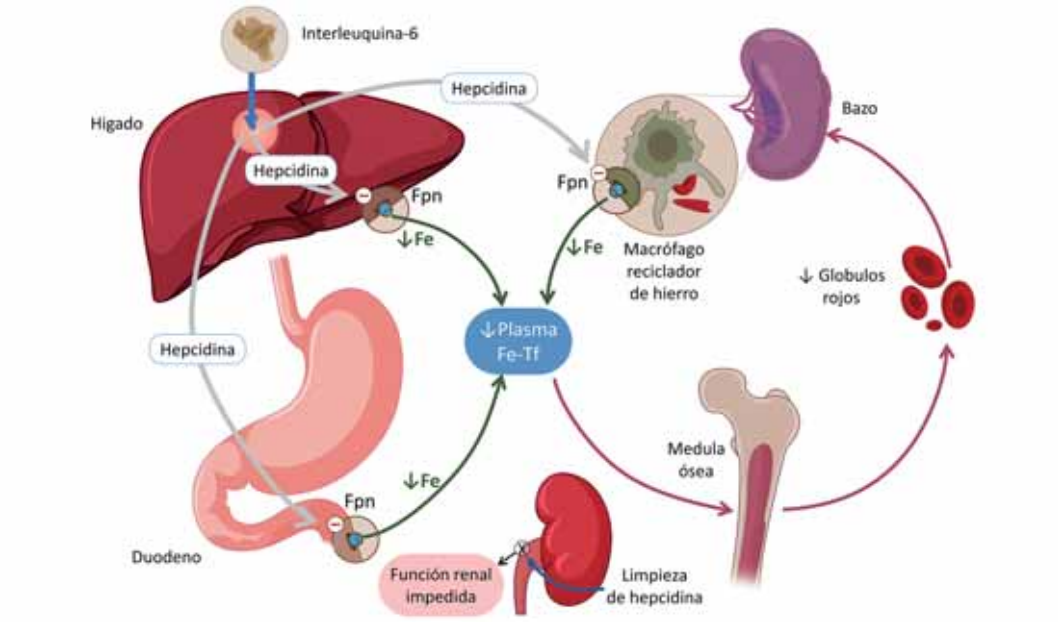


Figura 22-1. Cambios en la homeostasis del hierro en la anemia secundaria.

Eritropoyesis reducida

La IL-6 regula negativamente la expresión del gen SLC4a1 en precursores eritroides tardíos y, por lo tanto, reduce la síntesis de hemoglobina, esto también reduce la masa y la función mitocondrial de los progenitores eritroides. También se sugiere una inhibición directa de la eritropoyesis o la existencia de otras vías aún por establecer.

Se ha observado que el IFN-γ y en menor medida el IFN-α y -β inducen la apoptosis de las unidades eritroides formadoras de colonias. Esta acción está mediada en parte por la acción de la ceramida y debido a la reducción de los receptores de eritropoyetina en las células eritroides precursoras. Otras modalidades de acción del IFN incluyen la reducción de la cantidad y la actividad de la eritropoyetina, así como la reducción de la expresión de otros factores de crecimiento, como el factor de células madre.

Respuesta disminuida a la eritropoyetina

Esto puede explicarse en parte por el hecho de que las citoquinas, los lipopolisacáridos bacterianos y el IFN-γ inducen la formación de radicales libres de óxido nítrico y oxígeno, que inhiben directamente la expresión de eritropoyetina in vitro, la IL-6 también se ha relacionado con esta respuesta decreciente a la eritropoyetina.

Reducción de la sobrevida de los eritrocitos

Niveles altos de TNF-α e IL-6 se correlacionan con una mayor tasa de eritrofagocitosis, un proceso diseñado para eliminar los glóbulos rojos senescentes y dañados en situaciones normales, este daño es causado por citoquinas, endotoxinas y especies reactivas de oxígeno. Algunos experimentos con animales han revelado que dosis subletales de TNF-α pueden causar fagocitosis de eritrocitos por macrófagos.

3.3. Cuadro clínico

La clínica está comandada por la enfermdedad de base. La anemia es típicamente leve a moderada, sin embargo depende de la actividad de la enfermedad de base pudiendo llegar a ser severa. Habitualmente es asintomática.

Los exámenes de laboratorio, además de la anemia muestran un VCM normal (se describe que está disminuido en un 30% de los casos), hipoferremia, transferrina disminuida, saturación de la transferrina disminuida o normal, protoporfirina libre eritrocitaria aumentada y ferritina sérica aumentada, La principal diferencia con la anemia ferropriva es que la ferritina suele estar normal o aumentada. Es de mucha ayuda también la elevación de la VHS y de reactantes de fase aguda que no ocurren en la anemia ferropriva. En un paciente con anemia de enfermedades crónicas que además tiene anemia ferropénica el diagnóstico

diferencial es muy dificil ya que la ferritina puede estar falsamente elevada por la inflamación, en estos casos el estudio de los receptores de transferrina puede ayudar sin embargo no es un examen que esté fácilmente disponible.

3.4. Tratamiento

El tratamiento suele estar dirigido al control de la enfermedad de base, puede intentarse el tratamiento con eritropoyetina cuando la enfermedad de base no puede ser controlada, con respuestas no muy alentadoras.

4. ANEMIA DE ENFERMEDADES CRÓNICAS ESPECÍFICAS

Como se mencionó anteriormente, la anemia de enfermedades crónicas es una de las más frecuentes en personas adultas. A continuación, se describen brevemente algunas patologías involucradas en el desarrollo de anemia secundaria.

4.1. Infecciones

La infección por el parásito *Schistosoma spp* puede causar anemia secundaria. Dentro de los mecanismos parasitarios que contribuyen al desarrollo de la anemia se encuentran: (i) participación de citoquinas proinflamatorias como factor de necrosis tumoral α (TNF-α) e interleuquina 6 (IL-6), el mecanismo predominante, (ii) el paso ulcerativo de los huevos del parásito a través de la pared intestinal, lo que causa pérdida de sangre y (iii) secuestro esplénico de los eritrocitos, disminución en la vida media de los glóbulos rojos.

En pacientes con VIH (virus de la inmunodeficiencia adquirida), la anemia es una de las complicaciones hematológicas más comúnmente encontradas. La anemia que presentan estos pacientes se caracteriza por ser de tipo normocítica normocroma, arregenerativa, reservas normales de hierro y una defectuosa respuesta a eritropoyetina (EPO). Durante la infección por VIH se produce un aumento de hepcidina y se altera el metabolismo del hierro, además el virus afecta a los progenitores hematopoyéticos en la médula ósea y disminuye la respuesta a EPO. Por otro lado, las infecciones oportunistas que se producen como consecuencia de la infección por VIH también producen anemia, como por ejemplo infecciones por parásitos.

También se ha observado anemia en pacientes con tuberculosis (TBC). Es conocido que la TBC induce un estado inflamatorio crónico a nivel sistémico, lo cual contribuye a la síntesis de hepcidina, influyendo en la homeostasis del hierro. Para el *Mycobacterium tuberculosis* la obtención de hierro es un requisito clave para su sobrevivencia y replicación. Además se ha mencionado que los mecanismos para explicar la patogénesis de la anemia en estos pacientes incluyen supresión de la eritropoyesis por marcadores inflamatorios, entre otros aspectos.

4.2. Enfermedades autoinmunes

La glándula tiroides cumple un rol fundamental en el correcto funcionamiento del cuerpo humano. Su disfunción puede estar asociada a un aumento o disminución en la secreción de hormonas tiroideas, por anticuerpos antitiroideos que dañan la glándula o por anormalidades en los receptores de hormonas tiroideas. Dentro de sus roles, se encuentra la eritropoyesis por inducción en la secreción de EPO y proliferación de progenitores eritroides. Por lo cual, una reducción en hormonas tiroideas resulta en una deficiente estimulación de los progenitores eritroides en la médula ósea, una disminución en los niveles de EPO, llevando además a una disminución en la oxigenación de los tejidos. Además, la enzima tiroperoxidasa (TPO), enzima dependiente del grupo hemo, es requerida para la síntesis de hormonas tiroideas. Los pacientes con tiroiditis de Hashimoto (enfermedad autoinmune donde se produce una destrucción de la glándula tiroides, la cual es mediada por autoanticuerpos y por células inmunes) e hipotiroidismo subclínico presentan niveles más bajos de hierro sérico, por lo cual con niveles disminuidos de hierro se producirá un descenso en la producción de hormonas tiroideas al disminuir la actividad de la TPO. Además, es importante mencionar que la hormona triyodotironina (T3) se necesita para estimular la proliferación de los precursores eritroides y potenciar la producción de eritropoyetina.

En los pacientes con artritis reumatoidea (AR), una de las complicaciones más comunes es la anemia. Las células inmunes aumentan la producción de citoquinas, como TNF-α (factor de necrosis tumoral α), IL-1 (interleuquina 1), IFN-γ (interferón γ), los cuales provocan una disminución de la eritropoyesis y una disminución en la producción de eritropoyetina a nivel renal. También se ha observado que en pacientes con AR que presentan anemias más severas, existe un aumento de IL-6 (interleuquina 6), la cual induce la secreción de hepcidina y esta última inhibe a la ferroportina (encargada de liberar el hierro desde los enterocitos, macrófagos y hepatocitos en el plasma) y bloquea su función, con lo cual no se libera hierro al plasma.

4.3. Cáncer

La anemia asociada a cáncer se define como la anemia que se desarrolla producto del cáncer o como resultado del tratamiento antineoplásico. Se ha observado que en pacientes con cáncer, el metabolismo y la homeostasis del hierro generalmente se alteran.

La principal causa en el desarrollo de anemia en pacientes con cáncer corresponde a la quimioterapia y radioterapia, pero también se asocia a la pérdida de sangre que se produce en algunos tipos de cáncer, como gastrointestinal, genitourinario y ginecológico, supresión de la médula ósea, la cual puede ser causada por infiltración tumoral y quimioterapia, déficit funcional de hierro, debido a una insuficiente ingesta de hierro que puede ser causada por sangrado o por la pérdida de apetito que se produce en los pacientes con cáncer como consecuencia de su enfermedad y tratamiento. Los pacientes con cáncer pue-

den presentar un déficit funcional o absoluto de hierro, donde el déficit absoluto se refiere a que las reservas de hierro se encuentran agotadas y por lo tanto existe un inadecuado suministro de hierro, mientas que la deficiencia funcional se debe a niveles aumentados de hepcidina sérica, lo cual reprime la liberación de hierro a la circulación. En ambas situaciones existe una disminución en la disponibilidad de hierro para una adecuada eritropoyesis, lo cual desencadena anemia.

4.4. Enfermedad renal crónica

La anemia es una complicación común y significativa que afecta a los pacientes con enfermedad renal crónica (ERC), lo cual se asocia con una reducción en su calidad de vida, aumento de mortalidad y morbilidad. Dentro de los factores y causas de anemia en pacientes con ERC se encuentran disminución en la producción de EPO, déficit funcional y/o absoluto de hierro, supresión de la eritropoyesis debido a la producción de citoquinas inflamatorias, aumento en la producción de hepcidina y corta vida media de los eritrocitos. Debido a que en la enfermedad renal crónica se presenta un estado inflamatorio elevado, también se encuentran elevados los niveles de IL-6, con lo cual los niveles de hepcidina se encuentran aumentados y esto se asocia con niveles aumentados de ferritina sérica y bajos niveles de hemoglobina; estos niveles aumentados de hepdicina provocan disminución de la absorción de hierro, disminuye la liberación de hierro desde el hígado y desde los macrófagos del bazo, resultando en la consiguiente anemia que presentan los pacientes. Por otro lado, elucidar la vía del factor inducible por hipoxia (HIF), el cual responde a la disminución en la disponibilidad de oxígeno, contribuye a comprender la fisiopatología de la anemia en pacientes con ERC. En personas sanas, la producción de eritropoyetina se lleva a cabo en las células peritubulares del área corticotubular de los riñones, cuya localización en una zona con relativa hipoxia las hace más sensibles a pequeñas disminuciones en la disponibilidad de oxígeno, lo cual produce que aumente HIF y este lleva a un aumento en los niveles de eritropoyetina circulante. En condiciones de normoxia, la subunidad α de HIF es hidroxilada por las enzimas con dominio prolil hidroxilasa (PHD), con lo cual se reduce la producción de eritropoyetina, mientras que durante estados de hipoxia, la actividad de estas enzimas se reduce, por lo que la subunidad α de HIF se puede traslocar al núcleo donde forma un heterodímero funcional con la subunidad β, lo que permite la expresión de sus genes blanco, como es el caso de la EPO. En los pacientes con enfermedad renal crónica, el tejido renal se adapta a un menor consumo de oxígeno, el cual es producido por el menor flujo sanguíneo que llega hasta los riñones, por lo cual este órgano adopta un estado de “pseudo normoxia”, motivo por el cual las enzimas PHD se mantienen activas y disminuyen los niveles de eritropoyetina circulante generando una eritropoyesis ineficiente para suplir las necesidades del organismo. Por lo tanto la anemia en estos pacientes requiere de tratamiento tanto con eritropoyetina como con hierro endovenoso, actualmente están en desarrollo además estimuladores de HIF con buenos resultados preliminares.

4.5. Enfermedad hepática

Las enfermedades hepáticas crónicas se refieren a aquellas patologías del hígado que persisten por más de 6 meses, las cuales pueden causar un daño progresivo en el tejido hepático y llevar a una fibrosis del parénquima del tejido, lo cual se conoce como cirrosis. Los pacientes con cirrosis presentan niveles más bajos de transferrina y hierro sérico, por lo cual se produce un desbalance entre la pérdida y acumulación de hierro y la síntesis de transferrina, desarrollándose una anemia por déficit de hierro debido a una pérdida crónica de sangre desde várices gastroesofágicas y gastropatía hipertensiva. También es importante mencionar que se ha encontrado que la disminución en los niveles de hepcidina en pacientes con cirrosis provoca que se acumule hierro en el tejido hepático lo cual también contribuye a la progresión de la fibrosis del hígado, donde esta acumulación se asocia con un pobre pronóstico y desarrollo de carcinoma hepatocelular.

La anemia suele ser casi siempre multifactorial, suelen ser frecuentes los déficit nutricionales en alcohólicos crónicos (causa mas frecuente de cirrosis), en este mismo contexto el daño tóxico directo por consumo de alcohol de las células eritropoyéticas está descrito aunque no bien entendido; se postula que es producido por el metabolito acetaldehído que puede producir respuestas inmunitarias contra las células eritropoyéticas. Los niveles de acido fólico también suelen disminuir drásticamente con el consumo de alcohol debido a una alteración en su movilización y utilización.

El secuestro esplénico e hiperesplenismo secundario a hipertensión portal es una causa aunque menos frecuente de anemia.

Otra causa de anemia en pacientes con cirrosis avanzada es la hemolisis por metabolismo anormal de colesterol de la membrana de los eritrocitos que lleva a la formación de acantocitos y las llamadas *spur cells*.

5. LECTURAS SUGERIDAS

Ganz, T. “Anemia of chronic disease” In: Williams Hematology, K. Kaushansky, McGraw-Hill ,9 th Edition, New York 2016, pp. 549-557.

Jude A., Maduka M., Ughasorob D,. Anaemia of Chronic Disease: An In-Depth Review. Med Princ Pract 2017;26:1–9.

Ganz T. Anemia of inflammation. N Engl J Med. 2019 Sep 19;381(12):1148-1157.

Camaschella C, Nai A, Silvestri L. Iron metabolism and iron disorders revisited in the hepcidin era. Haematologica. 2020 Jan 31;105(2):260-272.

Smith, C., McLachlan, G., Al Shehri, H., Adriko, M., Arinaitwe, M., Atuhaire, A., Muheki Tukahebwa, E., LaCourse, E. J., Stanton, M., Stothard, J. R., & Bustinduy, A. L. (2019). Schistosoma mansoni Infection as a Predictor of Low Aerobic Capacity in Ugandan Children. The American journal of tropical medicine and hygiene, 100(6), 1498–1506. https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0922.

Chaparro, C. M., & Suchdev, P. S. (2019). Anemia epidemiology, pathophysiology, and etiology in low- and middle-income countries. Annals of the New York Academy of Sciences, 1450(1), 15–31. https://doi.org/10.1111/nyas.14092.

Marchionatti, A., & Parisi, M. M. (2021). Anemia and thrombocytopenia in people living with HIV/AIDS: a narrative literature review. International health, 13(2), 98–109. https://doi.org/10.1093/inthealth/ihaa036.

Durandt, C., Potgieter, J., Mellet, J., Herd, C., Khoosal, R., Nel, J. G., ... Pepper, M. S. (2019). HIV and haematopoiesis. South African Medical Journal, 109(8b), 40. doi:10.7196/samj.2019.v109i8b.13829.

Hella, J., Cercamondi, C. I., Mhimbira, F., Sasamalo, M., Stoffel, N., Zwahlen, M., Bodmer, T., Gagneux, S., Reither, K., Zimmermann, M. B., Risch, L., & Fenner, L. (2018). Anemia in tuberculosis cases and household controls from Tanzania: Contribution of disease, coinfections, and the role of hepcidin. PloS one, 13(4), e0195985. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195985.

Mukherjee, A., Kaeley, N., Dhar, M., Kumar, S., & Bhushan, B. (2019). Prevalence, characteristics, and predictors of tuberculosis associated anemia. Journal of family medicine and primary care, 8(7), 2445–2449. https://doi.org/10.4103/jfmpc.jfmpc_311_19.

Alqahtani S. (2021). Prevalence and Characteristics of Thyroid Abnormalities and Its Association with Anemia in ASIR Region of Saudi Arabia: A Cross-Sectional Study. Clinics and practice, 11(3), 494–504. https://doi.org/10.3390/clinpract11030065.

Ahmed, S. S., & Mohammed, A. A. (2020). Effects of thyroid dysfunction on hematological parameters: Case controlled study. Annals of medicine and surgery (2012), 57, 52–55. https://doi.org/10.1016/j.amsu.2020.07.008.

Mincer DL, Jialal I. Hashimoto Thyroiditis. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.; 2021.

Rayman, M. (2019). Multiple nutritional factors and thyroid disease, with particular reference to autoimmune thyroid disease. Proceedings of the Nutrition Society, 78(1), 34-44. doi:10.1017/S0029665118001192.

Tański W, Chabowski M, Jankowska-Polańska B, Jankowska E. Anaemia and iron deficiency in patients with rheumatoid arthritis and other chronic diseases. Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej. 2021; 75:143-51.

De las Cuevas Allende R, Díaz de Entresotos L, Conde Díez S. Anaemia of chronic diseases: Pathophysiology, diagnosis and treatment. Medicina Clínica (English Edition). 2021;156(5):235-42.

Yacoub MF, Ferwiz HF, Said F. Effect of Interleukin and Hepcidin in Anemia of Chronic Diseases. Anemia. 2020; 2020:3041738.

Abdel-Razeq H, Hashem H. Recent update in the pathogenesis and treatment of chemotherapy and cancer induced anemia. Critical Reviews in Oncology/Hematology. 2020; 145:102837.

Abiri B, Vafa M. Iron Deficiency and Anemia in Cancer Patients: The Role of Iron Treatment in Anemic Cancer Patients. Nutr Cancer. 2020;72(5):864-872. doi: 10.1080/01635581.2019.1658794.

Madeddu C, Gramignano G, Astara G, Demontis R, Sanna E, Atzeni V, et al. Pathogenesis and Treatment Options of Cancer Related Anemia: Perspective for a Targeted Mechanism-Based Approach. 2018;9(1294).

Busti, F., Marchi, G., Ugolini, S., Castagna, A., & Girelli, D. (2018). Anemia and Iron Deficiency in Cancer Patients: Role of Iron Replacement Therapy. Pharmaceuticals (Basel, Switzerland), 11(4), 94. https://doi.org/10.3390/ph11040094.

Li, WH., Zhang, JY., Liu, WH. et al. Role of the initial degree of anaemia and treatment model in the prognosis of gastric cancer patients treated by chemotherapy: a retrospective analysis. BMC Cancer 20, 414 (2020). https://doi.org/10.1186/s12885-020-06881-7.

Gilreath JA, Rodgers GM. How I treat cancer-associated anemia. Blood. 2020;136(7):801-13.

Batchelor EK, Kapitsinou P, Pergola PE, Kovesdy CP, Jalal DI. Iron Deficiency in Chronic Kidney Disease: Updates on Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. 2020;31(3):456-68.

Ryu, S. R., Park, S. K., Jung, J. Y., Kim, Y. H., Oh, Y. K., Yoo, T. H., & Sung, S. (2017). The Prevalence and Management of Anemia in Chronic Kidney Disease Patients: Result from the KoreaN Cohort Study for Outcomes in Patients With Chronic Kidney Disease (KNOW-CKD). Journal of Korean medical science, 32(2), 249–256. https://doi.org/10.3346/jkms.2017.32.2.249.

Portolés, J., Martín, L., Broseta, J. J., & Cases, A. (2021). Anemia in Chronic Kidney Disease: From Pathophysiology and Current Treatments, to Future Agents. Frontiers in medicine, 8, 642296. https://doi.org/10.3389/fmed.2021.642296.

Locatelli F, Fishbane S, Block GA, Macdougall IC. Targeting Hypoxia-Inducible Factors for the Treatment of Anemia in Chronic Kidney Disease Patients. American Journal of Nephrology. 2017;45(3):187-99.

Scheiner, B., Semmler, G., Maurer, F., Schwabl, P., Bucsics, T. A., Paternostro, R., Bauer, D., Simbrunner, B., Trauner, M., Mandorfer, M., & Reiberger, T. (2020). Prevalence of and risk factors for anaemia in patients with advanced chronic liver disease. Liver international: official journal of the International Association for the Study of the Liver, 40(1), 194–204. https://doi.org/10.1111/liv.14229.

Wang, C. Y., & Babitt, J. L. (2019). Liver iron sensing and body iron homeostasis. Blood, 133(1), 18–29. https://doi.org/10.1182/blood-2018-06-815894.

Provenzano, R., Lerma, E. V., & Szczech, L. (Eds.). (2018). Management of Anemia. doi:10.1007/978-1-4939-7360-6.

Gkamprela, E., Deutsch, M., & Pectasides, D. (2017). Iron deficiency anemia in chronic liver disease: etiopathogenesis, diagnosis and treatment. Annals of gastroenterology, 30(4), 405–413. https://doi.org/10.20524/aog.2017.0152.

Marroni, C. A., Fleck, A. M., Jr, Fernandes, S. A., Galant, L. H., Mucenic, M., de Mattos Meine, M. H., Mariante-Neto, G., & Brandão, A. (2018). Liver transplantation and alcoholic liver disease: History, controversies, and considerations. World journal of gastroenterology, 24(26), 2785–2805. https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i26.2785.

Bianco, C., Coluccio, E., Prati, D., & Valenti, L. (2021). Diagnosis and Management of Autoimmune Hemolytic Anemia in Patients with Liver and Bowel Disorders. Journal of Clinical Medicine, 10(3), 423. doi:10.3390/jcm10030423.

Capítulo

23

ANEMIAS HEMOLÍTICAS INTRACORPUSCULARES

José Díaz, Eduardo Retamales, Iván Palomo

Resumen

1. Introducción

2. Síndrome hemolítico
2.1 Clasificación de las anemias hemolíticas
2.2 Mecanismos de destrucción de los eritrocitos
2.2.1 Hemólisis extravascular
2.2.2 Hemólisis intravascular

3. Laboratorio en las anemias hemolíticas intracorpusculares

4. Alteraciones de la membrana eritrocitaria
4.1 Esferocitosis hereditaria
4.2 Eliptocitosis hereditaria
4.3 Hemoglobinuria paroxística nocturna

4.4 Alteraciones en la composición de lípidos
4.5 Alteraciones en el trasporte de iones

5. Eritroenzimopatías
5.1. Eritroenzimopatías de la vía glicolítica anaeróbica
5.2. Eritroenzimopatías del metabolismo de las hexosas monofosfato
5.3. Eritroenzimopatías del metabolismo del glutatión
5.4. Eritroenzimopatías del metabolismo nucleotídico

6. Hemoglobinopatías
6.1. Talasemias
6.2. Persistencia hereditaria de hemoglobina fetal
6.3. Hemoglobinopatías talasémicas
6.4. Hemoglobinopatías estructurales

7. Lecturas sugeridas

RESUMEN

Las anemias hemolíticas resultan de la destrucción acelerada de los eritrocitos, asociada a una disminución significativa de la vida promedio del eritrocito en sangre. La respuesta medular a la hemólisis provoca un aumento compensatorio de la eritropoyesis que puede alcanzar hasta 10 veces o más la cifra normal. En algunos casos la anemia hemolítica, puede estar compensada o acompañarse de anemia cuando el aumento de la eritropoyesis resulta insuficiente para compensar la magnitud de la destrucción de eritrocitos.

A nivel fisiopatológico se clasifican en intracorpusculares y extracorpusculares. En el primer caso, la hemólisis es causa de alteraciones intrínsecamente relacionadas a la estructura o fisiología del eritrocito y mayoritariamente es de características hereditarias; por otro lado, las causas de hemólisis extracorpusculares, son externas al eritrocito y generalmente adquiridas.

1. INTRODUCCIÓN

La masa de glóbulos rojos circulantes permanece constante, a través de varios mecanismos de regulación, que permiten satisfacer los requerimientos de oxígeno en los tejidos. La remoción de los eritrocitos senescentes se produce principalmente a nivel del Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM) localizado en la microcirculación del bazo, hígado y médula ósea. El tiempo de tránsito del eritrocito normal, a través de la microcirculación del bazo es menor a un minuto; sin embargo, si ha iniciado la eriptosis, su tránsito se enlentece hasta en dos horas, mecanismo que se denomina “atrapamiento o acondicionamiento esplénico”. El bazo es para el eritrocito un ambiente especialmente adverso para su estructura, metabolismo y por la mayor exposición a macrófagos del SFM; factores que relacionados a su vida promedio podrán determinar su remoción de circulación o destrucción extravascular. Por su parte, la médula ósea eritroide, responde de manera dinámica frente a los estímulos eritropoyéticos que permiten la producción y liberación de eritrocitos en la misma proporción con la que se destruyen (0,5-2,5%).

Las anemias hemolíticas, constituyen un amplio y heterogéneo grupo de enfermedades hematológicas, que presentan en común un aumento de la destrucción de eritrocitos, acortamiento de su vida promedio (menor de 105-135 días en adultos) y anemia regenerativa, por eritropoyesis compensatoria. Cuando la producción de eritrocitos aumenta lo suficiente para equilibrar la destrucción acelerada, desaparece la anemia; pero se mantiene el cuadro hemolítico como anemia hemolítica compensada. Por otra parte cuando, la destrucción de los eritrocitos, hace insuficiente la respuesta eritropoyética compensatoria genera un cuadro de insuficiencia medular relativa que da origen al síndrome hemolítico.

2. SÍNDROME HEMOLÍTICO

La eritropoyesis normal, ocurre en un periodo de entre 8 a 20 días. En este periodo los progenitores y precursores eritroides con capacidad mitótica hasta la etapa de eritroblastos policromáticos dan origen a los eritroblastos ortocromáticos que expulsan el núcleo y forman pirenocitos y reticulocitos, este último se mantendrá 3-4 días en la médula ósea para posteriormente migrar a sangre donde tardará 24 horas más en madurar a eritrocito maduro, para cumplir funciones de transporte de hemoglobina (Hb) por 120 días (105-135 días). Sin embargo, diversas causas pueden provocar la destrucción prematura de los glóbulos rojos (GR) que puede ser compensada por la respuesta de la médula ósea (MO) aumentando la eritropoyesis y la proporción de reticulocitos en sangre. El conjunto de síntomas, signos y marcadores de hemólisis con o sin eritropoyesis compensadora efectiva, definen el síndrome hemolítico (SH). En él, las manifestaciones clínicas y analíticas pueden variar dependiendo del estado de salud previo del paciente, la severidad de la anemia, la etiología de la hemólisis, la duración de esta o si predomina el mecanismo de destrucción intravascular o extravascular. Aunque el síndrome anémico es generalmente evidente en las anemias hemolíticas agudas; no ocurre lo mismo con las hemólisis crónicas adecuadamente tratadas, donde solo es posible de observar en pacientes que evolucionan con crisis hemolíticas e insuficiencia medular relativa. En forma secundaria las anemias hemolíticas (AH) generan 1) acumulación de los productos del catabolismo del grupo Hem entre ellos biliverdina, bilirrubina o 2) aumento en la excreción de urobilinógeno, estercobilina y urobilina.

Síndrome hemolítico agudo. El SH agudo se presenta rápida y bruscamente en un paciente previamente sano. Las manifestaciones clínicas son propias del síndrome anémico y sus mecanismos de compensación, correlacionan muy bien con la severidad de la anemia. Las características clínicas más frecuentes son palidez, ictericia, esplenomegalia, fiebre, fatiga, palpitaciones, dolor lumbar y/o abdominal. En el SH severo, el paciente puede desarrollar hemoglobinuria, insuficiencia renal y shock hipovolémico.

Síndrome hemolítico crónico. En el SH crónico las manifestaciones clínicas pueden evolucionar desde un cuadro asintomático sin anemia a uno severo por crisis hemolíticas y disminución brusca de la Hb, reticulocitosis y aumento de los marcadores de hemólisis. Al examen físico se observa palidez y/o ictericia leve-moderada y litiasis renal (cálculos de bilirrubinato de calcio). Las mayores complicaciones se observan en niños mal controlados durante el periodo de crecimiento, donde la expansión eritropoyética compensatoria a la hemólisis, retrasa el desarrollo y deforma el tejido óseo que delimita la médula ósea en los sitios de hematopoyesis como cráneo/cara. El resultado es el desarrollo de facies mongoloides/orientaloides, turricefalia, cráneo en cepillo (hueso frontal y parietales), malformaciones del maxilar y maloclusión.

Crisis megaloblástica. Es consecuencia del aumento de la demanda de folatos, por incremento compensatorio de la eritropoyesis. Se presenta de forma gradual y cursa con megaloblastosis medular y anemia arregenerativa.

Crisis aplásica. Afecta principalmente a pacientes con AH congénitas. Se manifiesta por una caída brusca de la Hb, reticulocitopenia y marcada disminución de los precursores eritroides en el aspirado medular. En la mayoría de los casos se debe a infección por parvovirus B19.

2.1. Clasificación de las anemias hemolíticas

Fisiopatológicamente se clasifican de acuerdo al origen de la alteración en intracorpusculares y extracorpusculares. En las anemias hemolíticas intracorpusculares (AHI) la causa o el defecto es propio o intrínseco al GR y generalmente son hereditarias. En el caso de las AH extracorpusculares (AHE) la causa o el defecto es externo al GR y generalmente son adquiridas (tabla 23-1 y figura 23-1).

Tabla 23-1. Clasificación fisiopatológica de las anemias hemolíticas

Causas intracorpusculares	Causas extracorpusculares
Membranopatías	**Inmunes**
Hereditarias	Anemias hemolíticas aloinmunes
Esferocitosis hereditaria	Anemias hemolíticas autoinmunes
Eliptocitosis hereditaria	
Alteraciones en el transporte de iones	**No inmunes**
Acantocitosis hereditaria	Agentes infecciosos
	Venenos
Adquiridas	Medicamentos
Hemoglobinuria paroxística nocturna	Agentes químicos
	Agentes físicos
Eritroenzimopatías	
EZ de la vía glicolítica anaeróbica	**Mecánicas**
EZ del metabolismo de las hexosas monofosfato	Hemoglobinuria de la marcha
	Microangiopatía trombótica
EZ del metabolismo del glutatión	
EZ del metabolismo nucleotídico	**Físicas**
	Quemaduras extensas o de tercer grado
Hemoglobinopatías	Radiaciones
Hemoglobinopatías estructurales	Congelación de extremidades
Talasemias	
	Infecciones
	Infecciones bacterianas
	Infecciones parasitarias
	Infecciones virales

Figura 23-1. Clasificación integrada de las anemias hemolíticas intracorpusculares y extracorpusculares.

2.2. Mecanismos de destrucción de los eritrocitos

La destrucción fisiológica de los glóbulos rojos (GR) o eriptosis, es el mecanismo principal de remoción de los GR (80-90%) y se relaciona con el tiempo de tránsito en circulación del GR, cercano a su vida promedio o GR senescentes. En la eritropoyesis el GR maduro mantiene un pool de enzimas esencialmente glicolítica, que no puede ser renovada (ausencia de núcleo), el deterioro de la misma al cabo de 120 días promedio, determina su destrucción extravascular en el SFM del bazo o hígado.

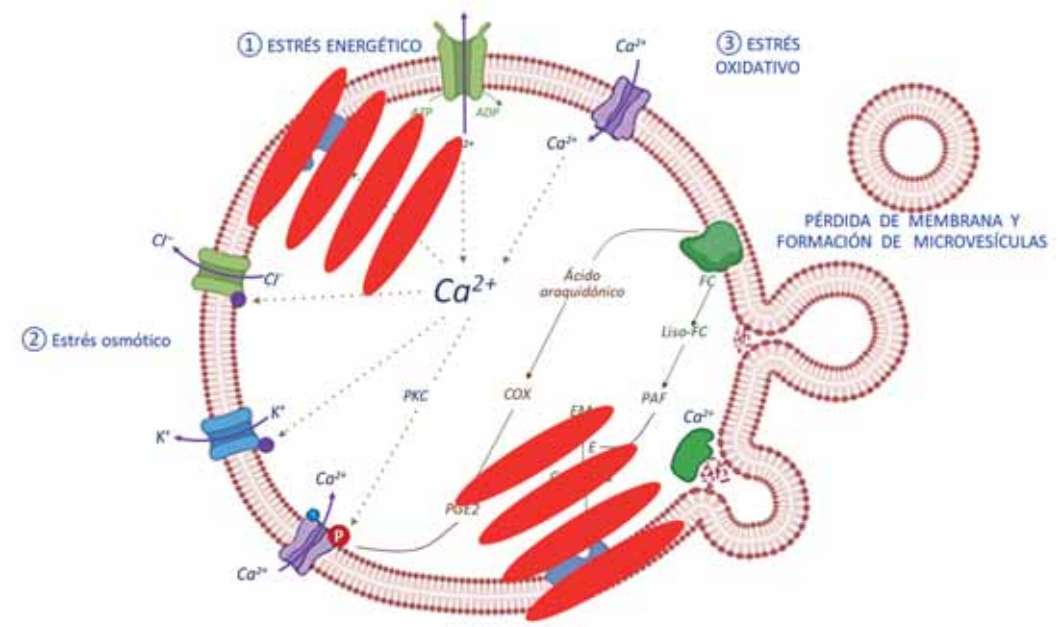


Figura 23-2. Eriptosis del eritrocito. Estrés energético oxidativo y osmótico por aumento del calcio intracelular, que induce inestabilidad y pérdida de membrana por microvesículas. El mecanismo estimula la expresión de fosfatidilserina (FS) en la capa externa y que reconocen los receptores CD14, CD36 y CD68 en macrófagos del SFM. La FS en la capa externa, también puede unir anexinas, β2 glicoproteína I y activar el complejo protrombinasa y la vía del complemento. Proteína quinasa dependiente de calcio (PKC), Ciclooxigenasa (COX), prostaglandina E2 (PGE2), fosfatidilcolina (FC); factor activador de plaquetas (PAF), esfingomielina (EM) y esfingomielinasa (E).

La eriptosis, ocurre a través de una serie de eventos bioquímicos en el GR, entre ellos: estrés energético, osmótico y oxidativo, relacionados al aumento del calcio intracelular (figura 23-2). **Estrés energético**, Al disminuir la síntesis de ATP, disminuye la actividad de la Calcio ATPasa y aumenta la concentración de calcio intracelular con los siguientes efectos (figura 23-2) (a) Inhibición de las traslocasas flipasas/flopasas: interfiere en el *scrambling* de membrana, (b) Aumento de la actividad de la escramblasa: aumenta de la expresión de fosfatidilserina en la capa externa de la membrana, (c) Activación de la proteína quinasa dependiente de Calcio: activación de los canales no selectivos de cationes y (d) Activación de calpaína: induce la proteólisis del citoesqueleto, desestabilización de la membrana y pérdida de membrana en la forma de microvesículas. **Estrés osmótico o hiperosmótico**, ocurre por la activación de canales de cloruro y potasio dependientes del aumento de calcio intracelular. El estrés osmótico produce lesión celular por deshidratación (figura 23-2) y aumento de la viscosidad interna del GR (elevación de la HCM) que disminuye aún más su capacidad de deformabilidad, otros efectos son (a) Aumento de la actividad de la fosfolipasa A2: Aumenta la síntesis de prostagladinas E2, que activa los canales no selectivos de cationes, aumentando por esta nueva vía, el calcio intracelular. (b) Aumento de la prostaglandina E2: activa los canales de potasio, favoreciendo la movilidad del catión al medio extra-

celular y (c) Activación de la esfingomielinasa, que transforma la esfingomielina en ceramida, un activador de la escramblasa. **Estrés oxidativo**, disminuye la síntesis de glutatión, activando los canales catiónicos, esto permite el ingreso de calcio y la movilización de potasio e iones cloruros al medio extracelular (Figura 23-2).

2.2.1. Remoción extravascular y hemólisis extravascular

El mecanismo de remoción extravascular o atrapamiento esplénico, de los eritrocitos es el que predomina (80-90%) en condiciones fisiológicas y permite mantener la homeostasis de la masa de eritrocitos; pero es también el mismo mecanismo, pero exacerbado el que produce hemólisis intravascular. El resultado del atrapamiento esplénico es la hemólisis del eritrocito o en su defecto el aumento del daño en la membrana del eritrocito.

En circulación sistémica, los eritrocitos senescentes (normales) o con alteraciones hereditarias, pierden la integridad de la membrana y la relación superficie/volumen; esto disminuye su capacidad de deformabilidad en la microcirculación del bazo, retardando hasta en dos horas su paso desde la circulación abierta del bazo, en la pulpa roja (eritrostasis) a los sinusoides esplénicos (Figura 23-3).

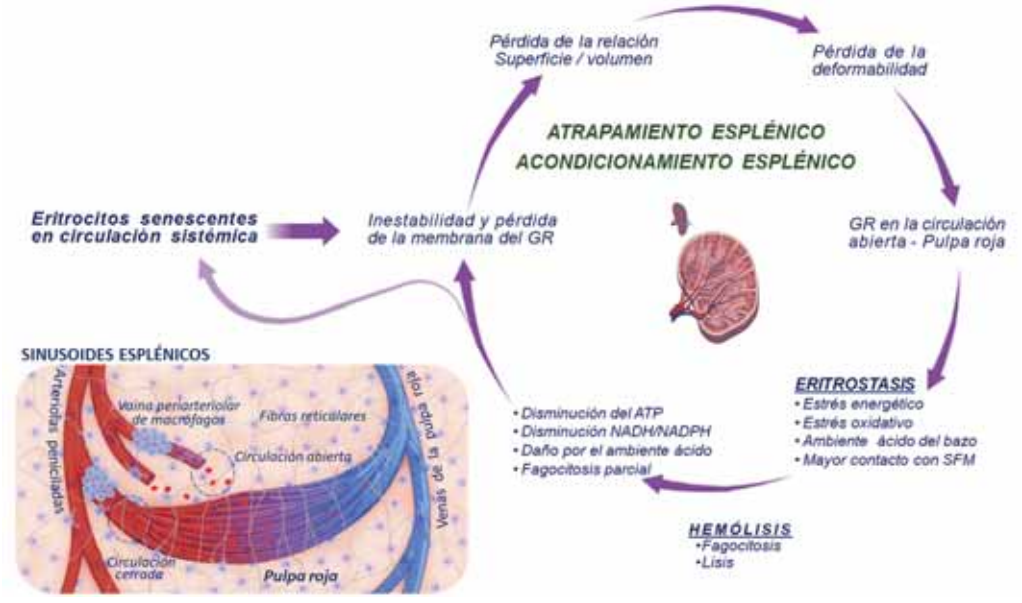


Figura 23-3. Remoción extravascular, atrapamiento o acondicionamiento esplénico. Eritrocitos senescentes (normales) o con alteraciones hereditarias que disminuyen la capacidad de deformabilidad de la membrana, quedan atrapados y son destruidos (hemólisis), en el adverso ambiente del bazo (pH ácido, disminución de los niveles de glucosa, alta concentración de oxidantes, y aumento del contacto con macrófagos).

La eritrostasis en el bazo, incrementa el estrés metabólico/oxidativo de los eritrocitos, que junto al daño inducido por el ambiente ácido del bazo, puede derivar en la fagocitosis (hemólisis) de los eritrocitos. En el macrófago, las macromoléculas estructurales del GR y las cadenas de globinas, se metabolizan a

sus componentes esenciales, que se conservan y reutilizan para la síntesis de lípidos, carbohidratos y proteínas. La Hb por su parte es metabolizada en: hierro, hem, y globinas. El grupo hem es catabolizado por el sistema "hem oxigenasa/ NADPH citocromo P450 reductasa", que requiere oxígeno molecular y NADPH, para romper el enlace alfa metano entre el pirrol A y B de la protoporfirina IX, esta reacción produce biliverdina IX, hierro libre y monóxido de carbono (CO).

- La biliverdina IX es rápidamente reducida en el macrófago a bilirrubina, por la biliverdina reductasa, dependiente de NADPH. En el plasma la bilirrubina se une a la albúmina y es transportada al hígado, donde se conjuga con ácido glucurónico formando bilirrubinglucurónido (glucurónido de bilirrubina) a través de la enzima UDP-glucuronil transferasa presente en el retículo endoplásmico de los hepatocitos. La bilirrubina conjugada es una molécula polar pero insoluble en lípidos, se excreta en la bilis y al llegar al intestino es convertida en urobilinógeno por la flora bacteriana. La mayor parte del urobilinógeno se excreta en heces, donde es oxidado a urobilina o estercobilina. Una pequeña fracción del urobilinógeno se reabsorbe en el intestino, ingresa a la circulación portal y es excretado hacia el intestino por el hígado. Parte del urobilinógeno reabsorbido, se filtra por la vía renal.
- El CO es liberado a la sangre y es transportado por los eritrocitos como carboxihemoglobina (cHb), hasta los pulmones donde se exhala.
- El hierro puede ser almacenado en la ferritina/hemosiderina en el macrófago, aunque la mayor proporción es transportada al plasma por la ferroportina, aquí se une a la transferrina, para luego ser captado por los macrófagos de las islas eritroides en la médula ósea, quedando disponible para la eritropoyesis (figura 23-4).

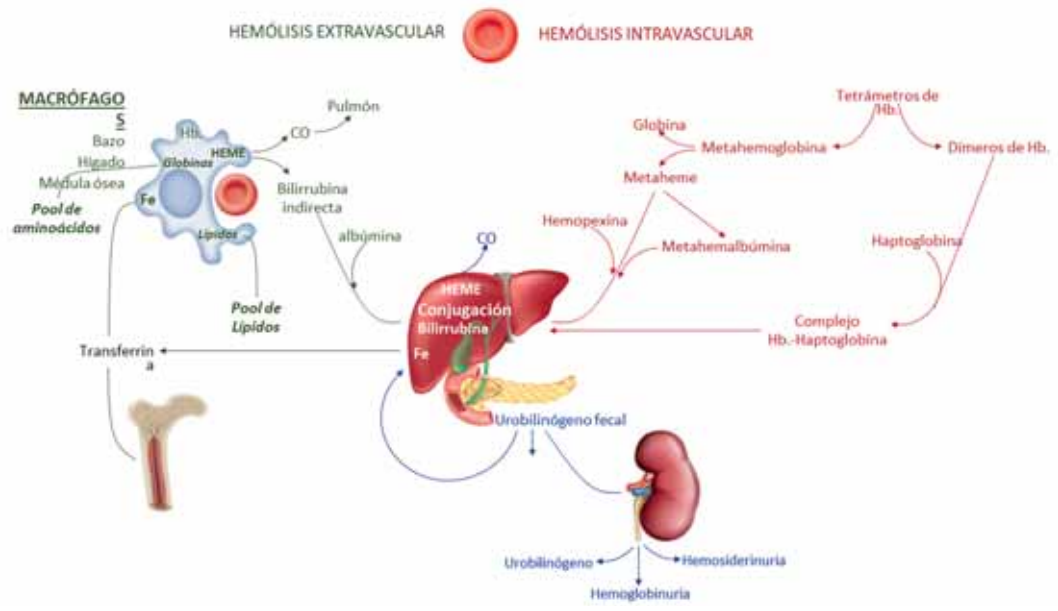


Figura 23-4. Representación integrada de la destrucción extravascular e intravascular de los eritrocitos o la exacerbación de estos mecanismos, que en un contexto patológico dan origen a la hemólisis extravascular e intravascular respectivamente.

El SFM del bazo, respecto del hígado, fisiológicamente es más eficiente, en la eliminación de eritrocitos con leves cambios asociados a eriptosis, debido a la estructura de la microcirculación del bazo, que requiere, eritrocitos con capacidad de deformabilidad intacta, para volver a circulación a través de los sinusoides esplénicos del bazo. Aunque el flujo de sangre al hígado (6% del gasto cardiaco) excede el del bazo (3%), el SFM del hígado elimina solo eritrocitos severamente afectados por eriptosis, dejando un remanente transitorio de poiquilocitos circulantes o poiquilocitosis normal (tabla 23-2)

Tabla 23-2. Poiquilocitosis normal en diferentes grupos etarios (mediana IC 95%)

Poiquilocitos	Prematuros	RN término	Adultos
Equinocitos	6,0 (1- 15)	1,0 (0- 4)	1,0 (0- 3)
Estomatocitos	3,0 (0- 7)	2,0 (0- 5)	1,5 (0- 4)
Knizocitos	3,0 (0- 7)	3,0 (0- 7)	0,0 (0- 0)
Queratocitos	3,0 (0- 7)	2,0 (0- 5)	0,2 (0- 1)
Esquistocitos	2,0 (0- 5)	0,5 (0- 2)	0,2 (0- 1)
Dacriocitos	1,5 (0- 4)	1,5 (0- 4)	0,2 (0- 1)
Codocitos	1,5 (0- 4)	1,5 (0- 4)	0,2 (0- 1)
Esferocitos	1,0 (0- 3)	0,2 (0- 1)	0,2 (0- 1)
Megalocitos	1,0 (0- 3)	0,2 (0- 1)	0,2 (0- 1)
Acantocitos	0,5 (0- 2)	1,0 (0- 4)	0,2 (0- 1)
Eliptocitos	0,2 (0- 1)	0,2 (0- 1)	0,2 (0- 1)
Eritrocitos normales	**40,0 (27 - 53)**	**43,0 (30 - 56)**	**97,0 (93-100)**

2.2.2. Destrucción intravascular y hemólisis intravascular

Representa entre el 10-20% de la destrucción fisiológica de los eritrocitos senescentes (figura 23-4). La destrucción intravascular, habitualmente ocurre por compresión de los GR, en los vasos sanguíneos de las articulaciones, plantas de los pies o bien, por exacerbación de este mecanismo que conduce a hemólisis intravascular. La Hb libre en el plasma (tetrámero), forma dímeros de Hb α-β, que se unen estequiométricamente a la haptoglobina (Hp) formando un complejo (Hb-Hp) que es depurado en el parénquima hepático (figura 23-4).

Hemólisis intravascular leve. El complejo Hb-Hp, es rápidamente transportado (9-30 minutos) y luego metabolizado en el parénquima hepático, esto provoca la disminución de la Hp libre en el plasma (marcador de hemólisis intravascular), que no es compensada ya que su síntesis hepática requiere de 5-7 días. En ausencia de Hp, los dímeros de Hb α-β en el plasma, filtran por la vía renal, pero son reabsorbidos por células del túbulo proximal y catabolizados a bilirrubina y hierro. Una proporción del hierro reabsorbido alcanza el plasma y otra se mantiene almacenada en las células tubulares, que al descamarse produce hemo-

siderinuria (tabla 23-3). En general la detección rutinaria de hemosiderinuria se realiza por citocentrifugación y posterior tinción con azul de Prusia o Turnbull; un resultado positivo, se puede interpretar como un signo reciente de hemólisis intravascular; en casos de hemólisis intravascular crónica, la hemosiderina además se presenta libre en la orina y en ausencia de hemoglobinuria.

Hemólisis intravascular moderada-severa. En este caso la Hb libre excede la capacidad de absorción de las células tubulares y filtran por la vía renal, detectándose en el uroanálisis por el color característico de la orina: rosado, rojo o negro parduzco según la severidad de la hemólisis. La Hb no excretada por el riñón, es depurada por el parénquima hepático o puede ser oxidada a metahemoglobina.

El hem oxidado, se disocia de la metahemoglobina y se une estequiométricamente a la hemopexina (Hx), formando un complejo, que se depura lentamente del plasma (7-8 horas) a través del parénquima hepático (tabla 23-3). Si la magnitud de la hemólisis consume la totalidad de la Hx, el grupo hem se une transitoriamente a la albúmina plasmática, formándose la methemalbúmina que se depura muy lentamente en el hígado o hasta que se restablezcan los niveles de Hp o Hx. Cuando los niveles plasmáticos de los complejos hemopexina-hem y methemalbúmina se encuentran elevados el plasma adquiere un color café característico (figura 23-4).

La hemólisis intravascular puede ser causada por: (a) activación del complemento sobre la membrana eritrocitaria, (b) lesión física o mecánica sobre el GR, y (c) exposición a sustancias químicas o hemotoxinas de venenos animales.

Tabla 23-3. Pruebas de laboratorio en la hemólisis extravascular e intravascular

Hemólisis extravascular		Hemólisis intravascular	
Bilirrubina indirecta	Elevada	Hb. plasmática	Elevada
Urobilina urinaria	Elevada	Haptoglobina sérica	Disminuida
Urobilinógeno urinario	Elevado	Hemopexina sérica	Disminuida
CO expirado	Elevado	Methemalbúmina	Elevada
		Hemoglobinuria	Elevada
		Hemosiderinuria	Positiva

3. LABORATORIO EN LAS ANEMIAS HEMOLÍTICAS INTRACORPUSCULARES

La historia clínica, junto a los exámenes de laboratorio que reflejan aumento de la destrucción de GR y/o compensación de la eritropoyesis, suelen ser suficientes para establecer el diagnóstico del SH y, posteriormente se podrá investigar su etiología a través de exámenes más específicos, dependiendo del tipo o subtipo de anemia intracorpuscular.

El hemograma sin duda es de gran utilidad en el diagnóstico inicial del SH. El volumen corpuscular medio (VCM) suele ser normal, aun cuando es posible observar leve aumento (98-105 fL) cuando aumenta la proporción de policromatófilos/reticulocitos. La concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) es habitualmente normal, de tal forma que, en general, las AH, se pueden clasificar como anemias normocíticas normocrómicas.

Pruebas de laboratorio y sus resultados que reflejan aumento de la eritropoyesis:
- Policromatofila (VR 0,5-2,5%). Aumento en sangre del número de GR de mayor tamaño y citoplasma policromático. En las Policromatofilias moderadas e intensas, el mayor tamaño de los policromatófilos provoca un aumento moderado del VCM.
- Eritroblastos en sangre (VR 0 /100 leucocitos). El SH, puede presentar precursores eritroides en sangre, generalmente eritroblastos ortocromáticos o reacción leucoeritroblástica.
- Reticulocitosis (RRR VR 0,5-2,5% ó RRA VR 23-155 K/uL en hombres y 21-135 K/uL en mujeres). El aumento de los reticulocitos se demuestra a través de: a) Recuento de Reticulocitos Relativo (RRR); b) Recuento de Reticulocitos Absoluto (RRA) y c) Recuento de reticulocitos corregido (RRC) según el siguiente planteamiento RRC = RRR x Hcto. del paciente/Hcto. Normal* (* en hombres 45% y mujeres 40%)
- Aumento del índice de producción reticulocitaria (IPR) >2,0. Es el mejor predictor de aumento de la eritropoyesis, en relación a otras expresiones de reticulocitos. El IPR se obtiene a través de la siguiente normalización matemática IPR = RRC / λ; donde λ es el tiempo de maduración en días y se calcula λ = 3,25 – [0,05 x Hcto. del paciente]
- Hiperplasia eritroblástica en médula ósea. Este análisis se menciona solo con un fin pedagógico ya que en general a nivel clínico no se utiliza para investigar hemólisis. El mielograma muestra un marcado aumento de serie eritroide en todos sus estadios madurativos. En algunos casos se puede observar eritrofagocitosis y un aumento del número de sideroblastos y del hierro macrofágico debido a la aceleración del recambio de hierro secundario a hemólisis.
- Recuento de plaquetas (VR 150-450 K/uL). Se produce trombocitosis reactiva, por reacción cruzada de la eritropoyetina elevada por hemólisis, sobre el receptor MPL de megacariocitos.

Pruebas de laboratorio y sus resultados que reflejan aumento de la destrucción de eritrocitos:
- Hemoglobina disminuida. Anemia de severidad variable, habitualmente normocítica normocrómica.
- Hemoglobina plasmática elevada. El aumento refleja la severidad de la hemólisis intravascular. Un color rosado en el plasma es detectable a simple vista cuando la concentración es superior a 20 mg/dL.
- Poiquilocitosis: Es variada y dependerá del tipo de defecto intracorpuscular, entre otros: esferocitos, microesferocitos, queratocitos, estomatocitos, acantocitos, codocitos, etc.
- Test de antiglobulina negativo. Es una prueba relevante en el diagnóstico diferencial de AHI y AHE de origen inmunes.
- Haptoglobina sérica disminuida (VR 30-200 mg/dL). Prueba sensible como marcador de hemólisis intravascular, pero inespecífica porque disminuye tam-

bién en pacientes con enfermedad hepática severa o en deportistas de alto rendimiento. Se encuentra elevada en: embarazo, reacciones de fase aguda, quemaduras, infecciones crónicas, artritis reumatoide, síndrome nefrótico, neoplasias, necrosis tisular, linfoma de Hodgkin, lupus, obstrucción biliar, terapia con esteroides y uso de anticonceptivos orales. En estas circunstancias, una concentración de Hp normal, no excluye la hemólisis.

- Hemopexina sérica disminuida (VR 0,5-1,2 g/L). Cuando la hemólisis intravascular es severa la Hx se encuentra disminuida; también se puede encontrar disminuida en otras condiciones patológicas, distintas a la enfermedad hemolítica, como enfermedad renal y hepática; por el contrario, su concentración se eleva en la diabetes mellitus, infecciones y carcinoma.
- Hemosiderinuria (VR negativo). Es un buen marcador de hemólisis intravascular, se encuentra elevada aún en ausencia de hemoglobinuria y puede persistir durante varias semanas después del episodio hemolítico pero, no es posible detectarla al inicio del SH o durante la fase aguda, incluso si se acompaña de hemoglobinemia y hemoglobinuria. El método utiliza una muestra citocentrifugada teñida con tinción de azul de Prusia según Rous, en la preparación la hemosiderina se puede encontrar: libre, en el citoplasma de células epiteliales y ocasionalmente en cilindros.
- Hemoglobinuria (VR negativo). Se presenta en la hemólisis intravascular y en caso de SH crónico puede generar déficit de hierro. La hemoglobinuria, también se presenta en hemorragias de la vía urinaria (riñón, uretra, vejiga) y en otras condiciones como: mioglobinuria hereditaria, esporádica, de esfuerzo, síndrome de aplastamiento, lesiones musculares, cardiacas o quemaduras.
- Urobilinógeno (VR excreción fecal 30-300 mg/día, excreción urinaria < 4 mg/día). Aunque aumenta en casos de hemólisis, no es específica ya que también aumenta en enfermedad hepática, anemias diseritropoyéticas congénitas o en casos de eritropoyesis ineficaz. El aumento de eliminación fecal de estercoblinógeno se acompaña de cierto grado de urobilinuria, lo que confiere una coloración oscura a la orina que puede sobreañadirse a la hemoglobinuria.
- Bilirrubina no conjugada (VR <1,0 mg/dL). EL aumento de la bilirrubina se produce a expensas de la bilirrubina no conjugada, no se excreta en la orina y se acumula en tejidos con alta proporción de fibras elásticas (paladar, conjuntiva); en ellos se observa ictericia, cuando supera los 2,0 mg/dL. La concentración de bilirrubina en sangre depende de: 1) la rapidez con que se produce el catabolismo del grupo hem y 2) de la capacidad del hígado para conjugarla/excretarla. Por tanto, la bilirrubina no es un buen marcador de hemólisis, ya que puede ser normal incluso cuando la hemólisis es evidente.
- Lactato deshidrogenasa isoenzima I (LDH-I) sérica (VR 18-28% de la LDH total). La LDH aumenta en la hemólisis intravascular y también en la anemia megaloblástica, infarto al miocardio, miopatías y otras alteraciones que presentan destrucción tisular.
- Ferritina plasmática (VR 24-336 ug/L en hombres y 11-307 ug/L en mujeres). En el SH la ferritina aumenta, especialmente en casos de hemólisis congénitas con eritropoyesis ineficaz. El aumento se intensifica, cuando el paciente es transfundido con concentrados de eritrocitos.
- Hierro sérico elevado y saturación de transferrina aumentada.

- CO espirado o cuantificación de carboxihemoglobina. Aumenta como consecuencia del catabolismo del Hem.

4. ALTERACIONES DE LA MEMBRANA ERITROCITARIA

Anemias hemolíticas intracorpusculares. La integridad del eritrocito depende de las propiedades funcionales y estructurales, que lo capacitan para realizar su función primaria relacionada con el transporte de oxígeno y dióxido de carbono. Estas propiedades son 1) la concentración, estructura y función de la Hb, 2) estructura e interacciones de las proteínas de la membrana eritrocitaria, y 3) componentes intracelulares relacionados con el metabolismo y el gradiente de iones intracelulares. La disfunción de alguna de estas propiedades, da lugar a alteraciones en las otras dos y tienen como resultado la disminución de la vida promedio del eritrocito. Los defectos en estas propiedades, pueden tener un origen genómico, afectando a precursores/progenitores eritroides, que se expresan como defectos intrínsecos o intracorpusculares en el eritrocito que conducen a su destrucción prematura o hemólisis. Estas alteraciones se las puede agrupar en (a) AH por defectos en la hemoglobina (hemoglobinopatías), (b) AH por defectos en la membrana eritrocitaria (membranopatías) y, (c) AH por defectos en las enzimas del eritrocito (eritroenzimopatías).

Estructura y membrana del eritrocito. La composición de la membrana del GR, es en gran parte responsable de su forma de disco bicóncavo y de la capacidad de deformabilidad; necesaria, para mantener las funciones fisiológicas del eritrocito como: transporte de Hb y coeficiente de permeabilidad para el intercambio gaseoso en tejidos y capilares pulmonares (figura 23-5).

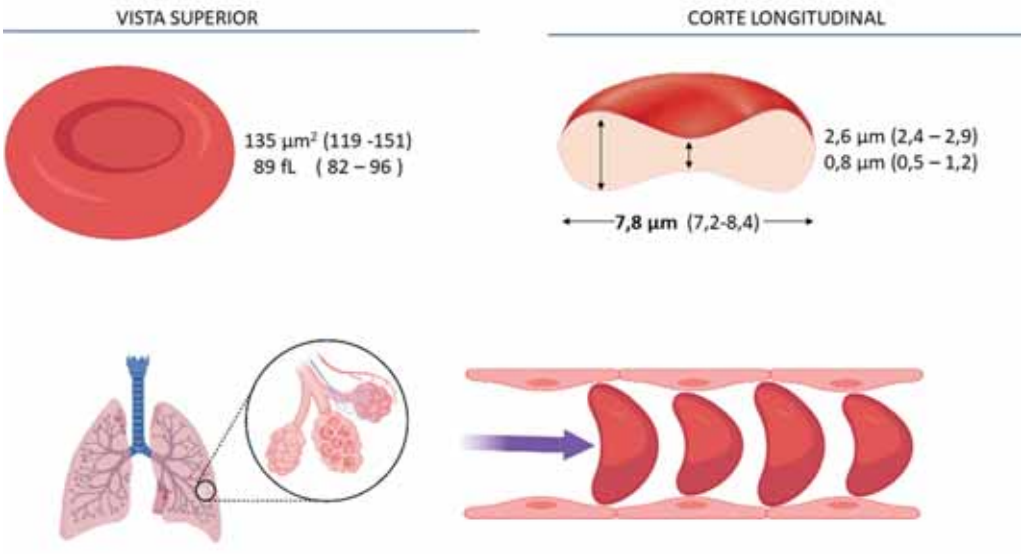


Figura 23-5. Representación de la morfología eritrocitaria normal. Se indican las dimensiones de volumen, superficie y su capacidad fisiológica de deformabilidad en los capilares pulmonares para realizar el intercambio gaseoso.

La morfología del eritrocito y sus capacidades funcionales dependen de las macromoléculas que componen su membrana, la que está compuesta por un 52% del peso en proteínas, 40% en lípidos y 8% en carbohidratos. La mayoría de los carbohidratos se encuentran en las glicoproteínas y una proporción menor en los glicolípidos. Los estudios a nivel de proteoma del eritrocito concluyen que el eritrocito presenta más de 2.650 proteínas, de las cuales 1.890 se presentan con más de 100 copias/GR. En cuanto a los lípidos de la membrana, predominan colesterol y fosfolípidos, distribuidos asimétricamente en la membrana (figura 23-6).

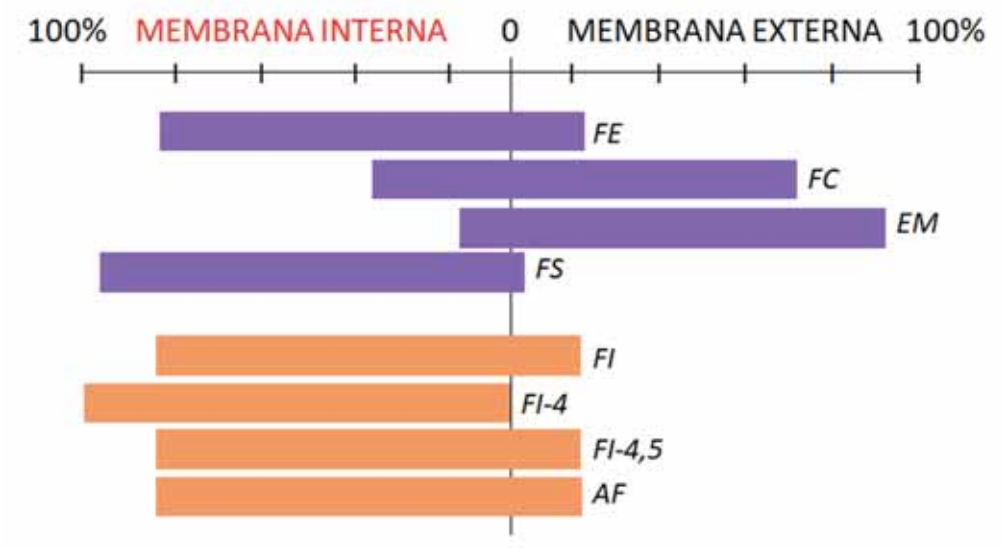


Figura 23-6. Distribución de fosfolípidos en la membrana del eritrocito. Fosfatidil etanolamina (FE), Fosfatidilcolina (FC), esfingomielina (EM), fosfatidilserina (FS), fosfatidil inositol (FI) y ácido fosfatídico (AF).

La proporción de fosfolípidos en la membrana de mayor a menor cuantía es: fosfatidiletanolamina (30 % del total de fosfolípidos), fosfatidilcolina (27 %), esfingomielina (23 %), fosfatidilserina (15 %) y en menor cuantía, fosfatidilinositol (5%). A esta bicapa lipídica y a través de interacciones apolares, se insertan las proteínas integrales o periféricas internas, según el modelo de Singer y Nicolson, que contribuyen a mantener la fluidez de la membrana.

Las proteínas periféricas internas entre otras las espectrinas, se asocian o interactúan con las proteínas integrales, con los fosfolípidos o entre sí, para formar un citoesqueleto (CE), que se extiende y cubre la capa interna o citoplasmática de la membrana eritrocitaria. Este CE es en gran parte responsable de mantener la forma, la estabilidad y la capacidad de deformabilidad del eritrocito, especialmente relevante en el transporte de oxígeno en capilares pulmonares y en el tránsito a través de los sinusoides esplénicos. Entre las proteínas que forman parte del CE destacan la espectrina α y β, ankirina, proteína 4.1R, proteína 4.2, dematina, aducina, tropomiosina y estomatina. Se describen a continuación las

proteínas más relevantes de la membrana eritrocitaria y que se las ha vinculado con membranopatías.

Banda 3 o intercambiador de aniones 1 (AE1). Es una proteína tetramérica que representa el 25-30% del total de las proteínas de la membrana. Se encuentra aislada en la membrana o formando parte de los complejos ankirina o actina. Estructuralmente su dominio citoplasmático se une al CE por interacción directa con las espectrinas o a través de la ankirina (complejo ankirina) o proteína 4.1R y 4.2 (complejo actina). Al dominio citoplasmático también se unen enzimas de la vía glicolítica y la Hb. En cuanto a su función, participa en el transporte de aniones y dióxido de carbono, acelerando el transporte de bicarbonato e iones cloruro a través de la membrana que favorece el equilibrio del bicarbonato entre el citoplasma del eritrocito y el plasma. En su dominio extracelular posee un sitio de glicosilación para el grupo sanguíneo I/i. La disminución de la concentración o función de la banda 3 se observa en eritrocitos senescentes o en AHI como membranopatías.

Glicoforinas. Son cuatro tipos de proteínas integrales (A, B, C y D) que, en conjunto representan el 4% de las proteínas de la membrana del eritrocito, su característica es la alta concentración de ácido N-acetilneuramínico, que otorga carga neta negativa al GR y que inhibe 1) la unión entre GR en circulación, 2) la unión a células endoteliales del vaso sanguíneo y 3) la activación del complemento. Estructuralmente las glicoforinas A, B y C contribuyen a la estabilidad de la membrana del GR, al unirse e interactuar, con proteínas periféricas internas de los complejos ankirina-actina y al mantener el intercambio de iones. Las glicoforinas A, B, C y D constituyen, el sustrato para la síntesis de diferentes grupos sanguíneos.

Espectrinas. Son proteínas periféricas internas, que forman parte importante del CE y otorgan al eritrocito su capacidad de deformabilidad y estabilidad de la membrana. Las espectrinas están compuestas por 2 subunidades α y β y representan el 14 y 16% respectivamente del total de las proteínas de membrana y entre el 50-75% de las proteínas del CE. Las subunidades α y β se unen de forma anti paralela por sus dominios de nucleación formando dímeros α-β; que posteriormente forman heterotetrámetros por interacción de dos dímeros a través de sus dominios de asociación, los que a su vez se unen entre sí, formando estructuras hexagonales. A los dominios de nucleación se une la banda 3 y la ankirina, mientras que a los dominios de asociación se unen diversas proteínas entre ellas glicoforinas, proteína 4.1R, aducina, dematina, tropomiosina, tropomodulina, y p55, conformando el complejo de vértice o del nodo. Finalmente, la α espectrina posee dominios de unión de baja afinidad al calcio, que podrían modular los efectos del calcio intracelular en el eritrocito.

Ankirina. Proteína periférica interna, monomérica, representa el 5% del total de las proteínas de membrana del GR. Las interacciones en que participa, permiten mantener la geometría y la capacidad de deformabilidad del eritrocito. La ankirina posee tres dominios: un dominio de unión a la membrana a través de

la banda 3, dominio de unión a espectrina y un dominio carboxilo terminal que modula la interacción del complejo ankirina. El complejo ankirina es estabilizado por la proteína 4.2 que da origen a un punto crítico de interacción entre el CE y la membrana eritrocitaria. La interacción del complejo ankirina con la espectrina, es cooperativa y promueve la formación de dímeros y tetrámeros de espectrina.

Actina-F. Proteína periférica interna, oligomérica, representa el 5% del total de las proteínas de membrana del GR. La actina-F es estabilizada por la unión a las espectrinas, proteína 4.1R, proteína 4.9, tropomiosina, aducina y tropomodulina (complejo actina).

Estomatina. Proteína integral, oligomérica, representa el 4% del total de las proteínas de membrana del GR y se encuentra asociada a los lípidos de rafts. La estomatina se une al transportador de glucosa Glut1, banda 3 y acuaporinas.

Proteína 4.1R. Proteína periférica interna, monomérica, representa el 3% del total de las proteínas de membrana del GR. forma parte del CE. Sus funciones son estabilizar la unión espectrina-actina y contribuir a estabilizar la interacción del CE con la bicapa lipídica a través del complejo actina.

Las interacciones entre las proteínas de membrana y el CE propiamente complejas; se han simplificado en dos tipos para la interpretación clínica: interacciones verticales y horizontales. Estas permiten comprender la base patológica de los déficits de proteínas de la membrana y del CE, que afectan la membrana eritrocitaria o membranopatías. **Interacciones verticales**, estas interacciones son perpendiculares al plano de la membrana eritrocitaria y comprenden aquellas interacciones que ocurren entre las proteínas del CE con: proteínas integrales, proteínas periféricas internas y lípidos de membrana. Los defectos en ellas producen desestabilización y desacoplamiento entre la bicapa lipídica y el CE, dando lugar a pérdidas de segmentos de membrana en la forma de microvesículas transformando el eritrocito en esferocito, el que posteriormente será removido por hemólisis extravascular en el bazo. Los defectos en las interacciones verticales se pueden producir entre el CE con: ankirina-banda 3, proteínas 4.1R, proteína Rh del complejo ankirina y lípidos de membrana. **Interacciones horizontales,** son paralelas al plano de la membrana y relevantes en la conformación del CE eritrocitario. Aportan a la estabilidad mecánica de la membrana, soportando las fuerzas de tensión del eritrocito en el flujo sanguíneo. Los defectos en las interacciones horizontales se producen por déficit cualitativos o cuantitativos en los sitios de nucleación o asociación de las espectrinas, o en el complejo del vértice o nodo. El fenotipo de eritrocito resultante es variado, pero en general se asocia a eliptocitos, dacriocitos y micropoiquilocitos.

4.1. Esferocitosis hereditaria

La Esferocitosis hereditaria (EH) o enfermedad de Minkowski Chauffard, descrita por Vanlair and Masius (1.875), es una anemia hemolítica intracorpuscular, en la que los GR son destruidos extravascularmente, principalmente en el bazo. Se

caracteriza por anemia de severidad variable, regenerativa, ictericia, esplenomegalia y presencia de esferocitos en sangre. Estos son consecuencia de defectos moleculares que afectan las proteínas del CE de la membrana eritrocitaria (tabla 23-4). La EH constituye la causa más frecuente de AH hereditarias en individuos caucásicos. El defecto se hereda de forma autosómica dominante (75% de los casos), autosómico recesivo (25%) y en casos aislados mutaciones *de novo*. Su prevalencia mundial se estima en 1:5.000 y 1:2.000 en Europa.

El diagnóstico se realiza en el primer año de vida, sin embargo, los estudios durante el período neonatal muestran anemia de grado variable e ictericia de predominio indirecto, que requiere en los casos más severos fototerapia y soporte transfusional respectivamente, y obliga a plantear el diagnóstico diferencial con anemia por incompatibilidad ABO entre la madre y el recién nacido.

Fisiopatología. El mecanismo fisiopatológico en la EH, está centrado en la disminución cualitativa o cuantitativa de las interacciones verticales de la membrana eritrocitaria. Los eritrocitos con el déficit, son física y mecánicamente inestables en la turbulencia y velocidad del flujo sanguíneo que provoca pérdidas de membrana (microvesículas), que transforma al eritrocito en esferocito. Este cambio en la morfología celular, disminuye la relación: superficie de la membrana del eritrocito/volumen corpuscular medio (figura 23-5) y aumenta la HCM; binomio que de manera sinérgica reduce la deformabilidad-flexibilidad del eritrocito. En la microcirculación del bazo, es donde el esferocito, enfrenta la mayor restricción al flujo, en el paso desde la circulación abierta del bazo en la pulpa roja, a los sinusoides esplénicos. Los esferocitos retenidos en la pulpa roja del bazo (eritrostasis) sufren hemólisis por atrapamiento o acondicionamiento esplénico (figura 23-3) que en el curso crónico de la enfermedad hemolítica, causa esplenomegalia, un signo clínico característico de los pacientes con EH (70-95% de los pacientes la presentan).

La diversidad del cuadro clínico, es otra característica de la EH (tabla 23-4), que puede variar desde una hemólisis compensada (paciente sin anemia) hasta un SH grave, que requiere soporte transfusional; esta variabilidad se explica por: (a) el tipo de proteínas y mutaciones que las afectan: *missense, nonsense, frameshift,* inserciones o deleciones, que conducen a diferentes fenotipos funcionales de proteínas; (b) el genotipo, ya que el cuadro clínico en pacientes heterocigotos en general es menos severo que en homocigotos o el cuadro clínico de un heterocigoto compuesto con dos mutaciones diferentes en *locus* diferentes, respecto de un doble heterocigoto con dos mutaciones diferentes en el mismo locus; (c) localización de la mutación en la proteína, que podría comprometer o no su estructura-función, en la interacción con otras proteínas, y (d) el *background* genético de cada individuo (participación de otros genes).

Tabla 23-4. Esferocitosis hereditaria, frecuencia y proteínas afectadas en pacientes de occidente

Proteína	Gen	Herencia	Frecuencia en EH	Hemólisis
Ankirina	*ANK1*	AD-AR- *novo*	30-60%	Leve-moderada
Banda 3	*SLC4A1*	AD	25-45%	Leve-moderada
β-espectrina	*SPTB*	AD- *novo*	15-25%	Leve-moderada
α-espectrina	*SPTA1*	AR	<5%	Severa
Proteína 4.2	*EPB42*	AR	<5%	Leve-Moderada
Complejo Rh			<1%	
Otras			<5%	

EH por déficit de ankirina. Constituye la causa más frecuente de EH, su concentración en la membrana es la mitad de lo normal, dificultando la interacción vertical con la banda 3. El efecto cooperativo del déficit desestabiliza la interacción entre las espectrinas (con síntesis normal) provocando su disminución, en la misma proporción que lo hace la ankirina; por esta razón el déficit de ankirina, también se conoce como deficiencia mixta ankirina-espectrina. A nivel clínico los pacientes presentan, AH de severidad variable y en el frotis de sangre se observa esferocitosis moderada-severa. Mutaciones de novo, afectan frecuentemente al gen *ANK1*, probablemente por el alto contenido de GC que predispone un *"slipped strand mispairing"* durante la replicación del *DNA*; a su vez, una proporción reducida de pacientes con síndrome de Kallmann presentan deleciones de genes que involucran el locus de la ankirina (8p11.2) que desarrollan EH, hipogonadísmo, y retraso en el desarrollo psicomotor.

EH por déficit de banda 3. Es la segunda causa más frecuente de EH. Los eritrocitos son igualmente deficientes en banda 3 y proteína 4.2, expresan el 15-40% de la concentración normal, causando la pérdida de las interacciones verticales con el CE del eritrocito. A nivel clínico los pacientes presentan SH crónico, de severidad variable con esferocitosis en sangre y una baja proporción de GR "pinzados" o "*mushroom*" que no se observan en otras membranopatías. En algunos pacientes con déficit de Banda 3 no presentan EH; es el caso de la acidosis tubular renal distal, criohidrocitosis, estomatosis, acantocitosis, anemias diseritropoyéticas congénitas (ADC) y ovalocitosis del sudeste de Asia, todas ellas entidades clínicas con núcleo fisiopatológico propio.

EH por déficit aislado en β-espectrina. En este caso, la mutación en un alelo del gen SPTB es suficiente para dar lugar a un SH de intensidad variable (haplosuficiencia), pero que no requiere soporte transfusional. En sangre es característica la presencia de esferocitos y hasta un 15% de acantocitos.

EH por déficit aislado en α-espectrina. Clínicamente se caracteriza por anemia hemolítica severa, con abundantes esferocitos y micropoiquilocitos. El patrón de herencia es autosómico recesivo para mutaciones nonsense o frameshift en el gen SPTA1, un alelo de baja expresión, con una variante intrónica que activa un *splicing* alternativo denominado α^{LEPRA}, que expresa solo el 16% de la α-espectri-

na. El déficit total de α-espectrina por mutaciones bialélicas en *SPTA1*, conduce a la forma más grave de EH, que se presenta con *Hydrops fetalis* y alta mortalidad en embarazos de término. Los padres de pacientes con EH asociada a *SPTA1*, incluso cuando portan un alelo nulo, son asintomáticos, con leve aumento de reticulocitos o aumento de la fragilidad osmótica en sangre incubada. La esplenectomía no produce una mejoría significativa de la anemia.

EH por déficit de proteína 4.2. Aunque presenta distribución mundial, es más frecuente en Japón. La EH asociada a mutaciones en EPB42, presentan ausencia total o casi total de la proteína 4.2 que desestabiliza y disminuye la concentración de banda 3 y CD47, que forma parte del complejo Rh; mientras que los portadores heterocigotos son asintomáticos. En sangre la anemia hemolítica es leve-moderada, con esferocitosis, ovalocitos y estomatocitos.

EH por déficit del complejo Rh. El complejo está formado por las proteínas de membrana Rh D y Rh CE, las que interactúan con la glicoproteína RhAG; estructuralmente se unen al CE estabilizando las interacciones verticales. En el fenotipo Rh_{null} se produce una mutación en el gen RHCE o en RHAG y ausencia de la expresión de las proteínas RhAG, RhD o RhCE en la membrana eritrocitaria. En el caso de pacientes con fenotipo Rh_{mod} presentan supresión parcial de la expresión del gen RH causada por mutaciones en el gen RHAG. A nivel clínico los pacientes presentan anemia hemolítica leve-moderada y característicamente esferocitosis y estomatocitos en sangre.

Clínica y laboratorio en la esferocitosis hereditaria. En el 75% de los casos, la EH es diagnosticada en la primera infancia y adolescencia, en pacientes que presentan o tienen antecedentes de anemia hemolítica crónica leve-moderada, regenerativa, asociada a ictericia, esplenomegalia y cálculos biliares de bilirrubinato de calcio. En el 40% de los recién nacidos con EH, se observa AH moderada-severa e ictericia que requiere de fototerapia. La crisis hemolítica del RN se ha relacionado con la disminución de la capacidad para conjugar la bilirrubina y con el aumento de 2,3-DFG, que podría desestabilizar las interacciones espectrina/actina/proteína 4.1R. No son infrecuentes las formas clínicas asintomáticas, que cursan únicamente con anemia hemolítica crónica regenerativa compensada.

Tabla 23-5. clasificación de las esferocitosis hereditarias, según la severidad de la hemólisis

	Asintomáticos	Leve	Moderada	Moderada-Severa	Severa
Herencia	AR	AD	AD, mutaciones de novo	AD, mutaciones de novo	AR
Proporción de las EH	1%	20-30%	60-70%	10%	<5%
Hemoglobina (g/dL)	Normal	>10,5	>8	6-8	<6
VCM	Normal	Límite inferior	Límite inferior	Límite inferior	Límite inferior
CHCM (g/dL)	Normal	34-37	34-38	35-39	>36
ADE (%)	Normal	12-19	16-23	20-30	>20
Esferocitos	-	+	++	++ - +++	++ - +++
Reticulocitos (%)	0,5-2,5	<6	>6	>10	>10
I.P.R	1,5-2,0	1,8-3,1	4,0-8,5	>8	>8
Bilirrubina (mg/dL)	Normal	1,0-2,0	>2,0	2,0-3,0	>3,0
FOE (sangre fresca)	N	N o LE	Elevada	Elevada	Elevada
FOE (sangre incubada)	LE	Elevada	Elevada	Elevada	Elevada
Proteínas de membrana †	Normales	En el límite inferior del VR	Déficit leve	Déficit leve	Déficit moderado
Esplenectomía parcial	No	Casi nunca ‡	En algunos casos ‡	En niños >5 años	En niños >3 años

† Espectrina, ankirina, banda 3, proteína 4.2, ‡ En adultos sometidos colecistectomía o con ictericia severa

La clasificación de las EH, según la severidad de la hemólisis se dividen en EH leves, moderadas y severas; esta clasificación está basada en marcadores de hemólisis: concentración de Hb, bilirrubina y proporción de reticulocitos, parámetros que correlacionan bastante bien con el grado de compensación de la hemólisis (tabla 23-5). Otra clasificación, es aquella que integra el comportamiento clínico de la EH y las clasifica en EH: típica, leve, grave, atípica y portador asintomático.

EH típicas, es la forma clínica más frecuente (60-70% de los casos). En general es diagnosticada en niños y adolescentes, pero se puede diagnosticar a cualquier edad. El paciente presenta anemia leve-moderada, no compensada, esferocitos en sangre y esplenomegalia leve. Puede evolucionar con crisis hemolíticas asociadas a: infecciones virales (síndromes mononucleósicos y parvovirus B19), embarazo o ejercicio físico intenso. Por lo general responden satisfactoriamente a la esplenectomía.

EH leves, es menos frecuente (20-30% de los casos). La mayoría de los pacientes son asintomáticos y solo una baja proporción presentan SH compensado,

anemia y esplenomegalia leve. En sangre la esferocitosis es mínima lo que dificulta el diagnóstico; pero es la reticulocitosis, que permite plantear el diagnóstico. Es por estos antecedentes que el diagnóstico se produce en la adultez, cuando los pacientes (asintomáticos) refieren antecedentes de esplenomegalia, cálculos biliares a edad temprana o cuadros de anemia que se agudizan por infección virales, embarazo o ejercicio físico intenso.

EH graves, es la forma menos frecuente (5-10% de los casos), los pacientes presentan anemia moderada-severa, con signos de eritropoyesis extramedular, que requiere soporte transfusional. Los pacientes con EH grave presentan típicamente esferocitos y acantocitos.

EH atípicas, se presenta en pacientes con SH crónico junto a: 1) Manifestaciones clínicas no hematológicas como retraso del crecimiento por alteración del desarrollo óseo, facies talasémicas, maduración sexual tardía o alteraciones neurológicas. En huesos largos se observa hiperplasia eritroide compensatoria, acompañada de expansión medular hacia el centro de la diáfisis, 2) Alteraciones cromosómicas, mutaciones o polimorfismos, que se expresan solo en presencia de mutaciones en proteínas que causan EH o 3) AH congénitas hereditarias, como hemoglobinopatías o eritroenzimopatías.

Portadores asintomáticos, los padres de pacientes con EH recesiva, son asintomáticos y solo presentan leves cambios asociados a hemólisis como reticulocitosis, disminución de la Hp y leve aumento de la fragilidad osmótica eritrocitaria en sangre incubada. Se estima que el 1% de la población de América del Norte y ciertas regiones de Europa son portadores asintomáticos.

Laboratorio. El diagnóstico de EH requiere el estudio detallado de la historia clínica del paciente, examen físico, pruebas de laboratorios y considerar el diagnóstico diferencial con AH autoinmunes, ADC y estomatocitosis hereditaria. La interpretación de una prueba de antiglobulina negativa, en pacientes adultos con AH autoinmunes, sin antecedentes familiares puede dificultar el diagnóstico diferencial, para ello se requiere el uso de técnicas de citometría de flujo, para evaluar la densidad de inmunoglobulinas en los eritrocitos, así como el uso de anticuerpos monoclonales que permitan la detección de determinadas proteínas de membrana. Se mencionan a continuación las pruebas de laboratorio que sugiere el ICSH para el diagnóstico de membranopatías.

Esferocitos y proporción de GR hiperdensos. El porcentaje de GR hiperdensos (% hiper), es actualmente un parámetro reportado por los analizadores Sysmex y representan los eritrocitos que presentan valores de HCM > 41 pg. (VR 0%). El % hiper, es considerado un buen predictor de EH cuando el paciente presenta antecedentes familiares y hemograma compatible con EH.

Concentración de Hemoglobina Corpuscular media (CHCM). El aumento de la CHCM > 36 g/dL (VR 32-36 g/dL), es un indicador de EH en pacientes con ictericia neonatal. En casos de EH con anemia hemolítica compensada, la CHCM se encuen-

tra sobre el límite superior del rango de referencia y proporciona una especificidad (E) de 86% y sensibilidad (S) de 70%, para el diagnóstico de EH (tabla 23-5).

Volumen Corpuscular Medio (VCM) y volumen medio de células esféricas (VMCE). El VCM es normal o se encuentra en el límite inferior del rango de referencia. El VMCE es mayor que el VCM, como resultado del aumento del volumen celular después de esferizar los eritrocitos expuestos a una solución hipoosmolar (analizadores B. Coulter). Una diferencia de VCM-VMCE > 9,6 fL con prueba de antiglobulina negativa es un buen indicador de EH (E: 90% y S: 100%).

Reticulocitos e índices reticulocitarios. Pueden ser útiles para diferenciar la EH de las causas adquiridas, en adultos con EH se observa un VCMret. menor de 100 fL. En los casos de EH leves o portadores asintomáticos, la relación: Reticulocitos/Fracción de reticulocitos inmaduros (IRF) es >19%.

Glóbulos rojos microcíticos (MicroR) y glóbulos rojos hipocrómicos (Hypo-He). En la EH moderada-severa se observa una relación elevada MicroR/Hypo-He que proporciona una S:100% para el diagnóstico de EH.

Fragilidad osmótica eritrocitaria (FOE). Los eritrocitos normales expuestos a un gradiente hipotónico aumentan su volumen intracelular hasta un 70% lo cual permite evaluar la resistencia de la membrana. La FOE depende de la relación superficie/volumen del eritrocito, y de la HCM; ambas alteradas en el esferocito (figura 23-7). La prueba se puede ejecutar: (1) en sangre fresca, al exponer los eritrocitos a un gradiente hipotónico de cloruro de sodio-buffer fosfato, a temperatura ambiente o (2) en sangre incubada por 24 h a 37 °C., en el mismo gradiente hipotónico (S: 70% para el diagnóstico de EH). Durante décadas fue el método gold standard, para el diagnóstico de EH, sin embargo, ha sido reemplazada por pruebas más sensibles y específicas como la ectacitometría y EMA.

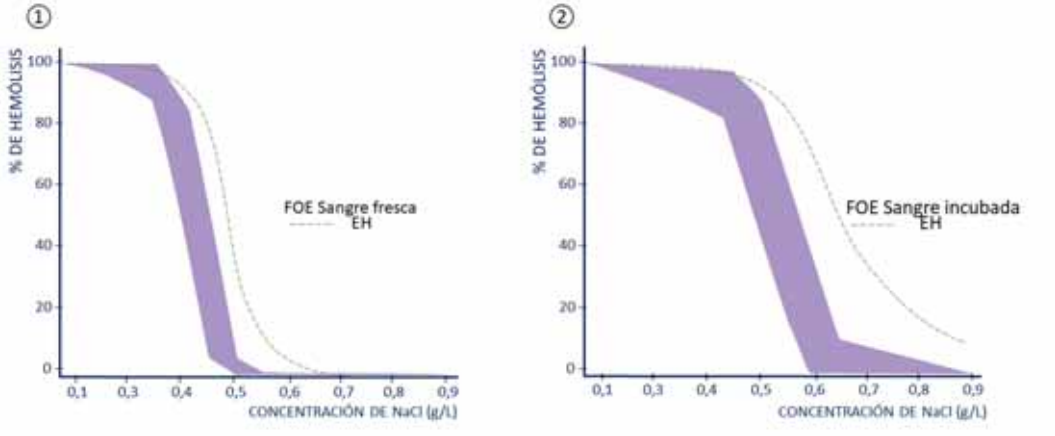


Figura 23-7. Representación de la fragilidad osmótica eritrocitaria en pacientes con esferocitosis hereditaria (EH). El área en color lila corresponde al VR de hemólisis en 1) sangre fresca y 2) en sangre incubada. La línea segmentada representa la curva de hemólisis en pacientes con EH.

Ectacitometría. La prueba, de la deformabilidad eritrocitaria con gradiente de osmolaridad u osmótico, se realiza en un ectacitómetro (viscosímetro de difracción de luz) que mide la capacidad de deformabilidad de los GR a través de luz láser, cuando los eritrocitos se enfrentan a un gradiente de osmolaridad (figura 23-8). La curva o perfil de deformabilidad basado en el índice de elongación, proporcionan información sobre la viscosidad interna (hidratación) del GR, pérdida de superficie y la relación superficie/volumen del eritrocito entre otras variables. El método es útil para el diagnóstico de trastornos, que de alguna manera afectan la deformabilidad o transporte de iones en el eritrocito. La ectacitometría es actualmente el método de referencia para el diagnóstico de EH (E:100%).

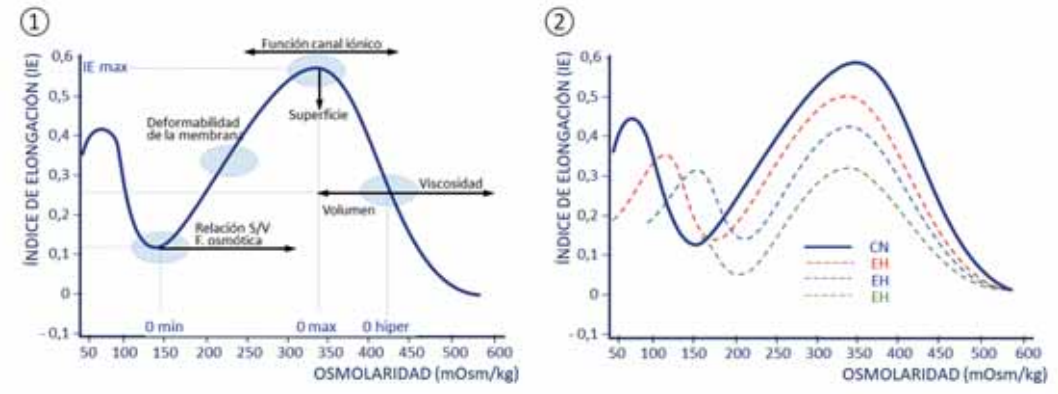


Figura 23-8. Ectacitometría en eritrocitos normales y en pacientes con esferocitosis hereditaria (EH). 1) interpretación del trazado de una curva normal y 2) esferocitosis hereditaria en pacientes que presentan concentraciones de espectrina de 80%, 60% y 30% respectivamente.

Prueba de la unión a la eosina-maleimida (EMA). La eosina-5'-maleimida es un compuesto fluorescente, que se une de forma estequiométrica (80% del reactivo) a la lisina 430 del *loop* extracelular la banda 3; el 20% restante, se une a otras proteínas de membrana, como las del complejo Rh, RhAG y CD47. El método relaciona la intensidad de la fluorescencia y la concentración de la banda 3 en eritrocitos; pero además el déficit secundario de banda 3, por deficiencia primaria de espectrina, ankirina, CD47 y proteína 4.2. La prueba es altamente sensible (92-100%) y específica (94-100%) por lo que se ha convertido en uno de los principales métodos de diagnóstico de EH (valor predictivo positivo 98%). El estudio de EMA es también útil en el diagnóstico de piropoiquilocitosis hereditaria, ADC y anemia hemolítica autoinmune.

Panel y subpanel next-generation sequencing assay (NGS) para anemias hemolíticas. El ensayo detecta mutaciones en regiones específicas de 39 genes, relacionadas con AH. El panel proporciona una evaluación genómica completa en pacientes con antecedentes personales o familiares sugerentes de AH hereditarias e incluye alteraciones de la membrana eritrocitaria, el transporte de iones, eritroenzimopatías y ADC (tabla 23-6).

Tabla 23-6. Panel y subpanel next-generation sequencing assay (NGS) para anemias hemolíticas

Gen		GenBank AN	Promotor / Exón / Intrón
AK1	Adenilato quinasa	NM_000476.2	Exón 1-7
ALDOA	Aldolasa	NM_000034.3	Exón 1–14
ANK1	Ankirina	NM_000037.3	Exón 1-43
ANK2	Ankirina	NM_000037.4	Intrón 41
CDIN1	CDAN1 interacting nuclease 1	NM_001130010.1	Exón 1-11
CD59	MAC-IP, MIRL, protectina	NM_203330.2	Exón 1, 3-6
CDAN1	Codanina 1	NM_138477.2	Exón 1-28
EPB41	Proteína 4.1R	NM_001166005.1	Exón 1-21
EPB42	Proteína 4.2	NM_000119.2	Exón 1-13
FANCA	GCA-Anemia Fanconi	NM_000135.2	Exón 1-43
FANCC	GCC-Anemia Fanconi	NM_000136.2	Exón 1-15
FANCC	GCC-Anemia Fanconi	NM_000136.2	Intrón 13
FANCG	GCG-Anemia Fanconi	NM_004629.1	Exón 1-14
G6PD	G6 fosfato deshidrogenasa	NM_001042351.2	Exón 1-13
GATA1	GATA binding protein 1	NM_002049.3	Exón 1-6
GCLC	γ - Glutamato-cisteína ligasa	NM_001498.3	Exón 1-16
GPI	G6 fosfato isomerasa	NM_000175.4	Exón 1-18
GSR	Glutatión reductasa	NM_000637.3	Exón 1-13
GSS	Glutatión sintetasa	NM_000178.3	Exón 1-13
GYPC	Glicoforina C y D	NM_002101.4	Exón 1-4
HBB	β-Globina	NM_000518.4	Promotor
HBB	β-Globina	NM_000518.5	Exón 1-3
HBB	β-Globina	NM_000518.5	Intrón 1-3
HBD	δ-Globina	NM_000519.3	Exón 1-3
HBD	δ-Globina	NM_000519.3	Intrón 1-2
HK1	Hexokinasa	NM_033496.2	Exón 1-18
HMOX1	Heme oxigenasa	NM_002133.2	Exón 1-5
KIF23	Kinesina	NM_138555.3	Exón 1-23
KLF1	Kruppel-like factor 1	NM_006563.3	Promotor
KLF1	Kruppel-like factor 1	NM_006563.4	Exón 1-4
NT5C3A	Pirimidina 5 nucleotidasa	NM_0010020010.2	Exón 1-9
PFKM	Fosfofructoquinasa	NM_000289.5	Exón 1-23
PGK1	Fosfoglicerato quinasa	NM_000291.3	Exón 1-11
PIEZO1	Canal ionico Piezzo	NM_001142864.3	Exón 2-51
PIEZO1	Canal ionico Piezzo	NM_001142864.3	Intrón 14
PKLR	Piruvato quinasa	NM_000298.5	Promotor
PKLR	Piruvato quinasa	NM_000298.6	Exón 1-11
PKLR	Piruvato quinasa	NM_000298.6	Intrón 10
RHAG	Grupo sanguíneo Rh	NM_000324.2	Exón 1–10
RPS19	Proteína ribosomal S19	NM_001022.3	Exón 1-6
SEC23B	Sec23 homólogo A	NM_001172745.2	Exón 1-20
SEC23B	Sec23 homólogo A	NM_001172745.2	Intrón 2-15
SLC2A1	Solute Carrier Family 2 (Glut-1)	NM_006516.2	Exón 1–10

SLC4A1	Solute Carrier Family 4 (Banda 3)	NM_000342.3	Exón 1-20
SLC4A1	Solute Carrier Family 4 (Banda 3)	NM_000342.3	Intrón 2
SPTA1	α-espectrina	NM_003126.2	Exón 1–52
SPTA1	α-espectrina	NM_003126.2	Intrón 30
SPTB	β-espectrina	NM_001355436.1	Exón 1-35
STOM	Estomatina (proteína 7.2)	NM_004099.5	Exón 1-7
TPI1	Triosa fosfato isomerasa	NM_000365.5	Promotor
TPI1	Triosa fosfato isomerasa	NM_000365.6	Exón 1-8
UGT1A1	UDP glicosiltransferasa 1 A1	NM_000463.2	Promotor
UGT1A1	UDP glicosiltransferasa 1 A1	NM_000463.2	Exón 1-5

Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) con densitometría. Es uno de los procedimientos clásicos, para demostrar el déficit de proteínas en la membrana del GR; también puede revelar la composición anormal de variantes de banda 3 en anemias ADC o espectrinas en la piropoiquilocitosis. Esta técnica permite por sí misma el diagnóstico de EH en aproximadamente un 70% de los casos de membranopatías, ya que no puede detectar el déficit, de algunas proteínas como GLUT1, RhAG y Piezo1.

Otras. Son pruebas menos utilizadas y en general tienen una orientación de *screening* e interpretación cualitativa; estas son: tiempo de lisis por glicerol acidificado, prueba de criohemólisis y autohemólisis.

Tratamiento. La EH no posee tratamiento curativo. Los pacientes con variantes leves no requieren tratamiento. En casos severos, con hemólisis intensa, la esplenectomía parcial o subtotal es el tratamiento de elección (tabla 23-5). La esplenectomía disminuye la severidad de la hemólisis, la reticulocitosis y aumenta la sobrevida del eritrocito en sangre (figura 23-3).

Post-esplenectomía, el hemograma presenta cambios como leucocitosis con neutrofilia, posteriormente linfocitosis y monocitosis. El recuento de plaquetas también aumenta, para luego disminuir paulatinamente hasta alcanzar la cifra normal de un adulto. La Hb aumenta, disminuye o desaparece la anemia, pero persiste la esferocitosis que ahora coexiste con acantocitos, codocitos e inclusiones como cuerpos de Howell-Jolly y Pappenheimer. Todos los candidatos a esplenectomía deben recibir una serie completa de vacunas contra neumococo, meningococo y Haemophilus influenzae. Se recomienda además vacunación anual contra la influenza, para reducir la posibilidad de infecciones bacterianas secundarias y sepsis postesplenectomía (función inmune del bazo). Por ese motivo la esplenectomía debe aplazarse siempre que se pueda hasta los 3 años de edad y si es posible hasta los 6-9 años.

4.2. Eliptocitosis hereditaria

La eliptocitosis hereditaria (ELH) descrita por Dresbach en la universidad de Columbus-Ohio (1.904), es un grupo heterogéneo de trastornos, que se heredan

de forma autosómica dominante, excepto un subtipo grave, la piropoiquilocitosis, que se hereda de forma recesiva. Su característica, es el aumento del índice elipsoidal de los eritrocitos, que adquirieren forma ovalada o elíptica permanente (eliptocitos). Este cambio morfológico es consecuencia de la pérdida de las interacciones horizontales por defectos moleculares en proteínas del CE del GR (tabla 23-7).

Tabla 23-7. Eliptocitosis hereditaria, frecuencia y proteínas que afecta en pacientes de occidente

Proteína	Gen	Herencia	Frecuencia ELH	Hemólisis/clínica
Eliptocitosis				
α-espectrina	SPTA1	AD	65%	Heterocigoto / asintomática Homocigoto† / AH severa
β-espectrina	SPTB	AD	30%	Heterocigoto / Clínica variable Homocigoto† / Fatal
Proteína 4.1R	EPB41	AD	6%	Heterocigoto / asintomático o AH leve Homocigoto† / AH severa
Ovalocitosis del Sudeste de Asia				
Banda 3	SLC4A1	AD	100%	Heterocigoto / asintomático/AH leve Homocigoto / fatal in útero

†Incluye casos de heterocigotos compuestos en pacientes que presentan dos mutaciones de espectrina diferentes, heredadas de cada padre, en lugar de la misma mutación de espectrina heredada de ambos padres (homocigotos).

ELH por déficit de α-espectrina, se presenta aproximadamente en el 65% de los casos, por mutaciones del gen SPTA1, que generan defectos estructurales en la espectrina α. La mayoría de los pacientes heterocigotos son asintomáticos (un alelo mutado). Los pacientes homocigotos o doble heterocigotos presentan anemia severa y marcada anisopoiquilocitosis desde la etapa neonatal, por defectos en la estabilidad de la membrana eritrocitaria a temperatura corporal o piropoiquilocitosis hereditaria.

ELH por déficit de β-espectrina, corresponde a la segunda causa más frecuente de ELH (30% de los casos) por mutaciones del gen SPTB. La expresión clínica del déficit es variable y depende del tipo de mutaciones homocigotas o dobles heterocigotas implicadas.

ELH por déficit de proteína 4.1R, es la causa menos frecuente de ELH (6% de los casos) y es causada por mutaciones del gen EPB41. Los portadores heterocigotos presentan abundantes eliptocitos y ausencia de hemólisis; los pacientes homocigotos presentan SH crónico y anemia moderada-severa.

Desde el punto de vista clínico, morfológico y molecular, las ELH se pueden dividir en tres tipos: ELH común, ELH esferocítica y ovalocitosis del Sudeste de Asia. ELH común es el tipo más frecuente; se desconoce su verdadera incidencia (1:2.000-1:4.000) ya que muchos pacientes son asintomáticos. Los defectos moleculares en la ELH común están en los dominios de asociación de las espectrinas o en las proteínas 4.1R. La ELH común, se clasifica a su vez en subtipos clínicos (tabla 23-8), no relacionados a defectos moleculares específicos. Los hallazgos en sangre en los diferentes subtipos, con excepción del portador, muestran una elevada proporción de eliptocitos (tabla 23-8) y de otros poiquilocitos (micropoiquilocitos) que están relacionados con la inestabilidad de la membrana y que resultan en AH esporádicas o SH crónico. Los pacientes con ELH severa requieren soporte transfusional permanente y la esplenectomía es una alternativa terapéutica para disminuir la hemólisis.

Tabla 23-8. Clasificación de la eliptocitosis hereditaria común.

ELH común	Hallazgos clínicos	Morfología eritrocitaria
ELH típica	Asintomática	Eliptocitosis severa
Portador	Asintomática	Eritrocitos normales
ELH con hemólisis	Hemólisis esporádica en respuesta a infección. Hemólisis moderada-severa compensada.	Eliptocitosis severa, micropoiquilocitos y poiquilocitosis
ELH homocigoto o heterocigoto compuesto	Hemólisis moderada-severa, que requiere de soporte transfusional.	Eliptocitosis severa, esferocitos, micropoiquilocitos y poiquilocitosis
Piropoiquilocitosis	Ictericia neonatal y hemólisis severa	Eliptocitos, esferocitos, microesferocitos y micropoiquilocitos
ELH con poiquilocitosis infantil	Ictericia, hemólisis y poiquilocitosis neonatal, hasta el primer año de vida	Eliptocitos, esferocitos, microesferocitos y micropoiquilocitos
ELH con diseritropoyesis	Hemólisis esporádica asociada a displasia y eritropoyesis inefectiva	Eliptocitosis severa, micropoiquilocitos y poiquilocitosis

Piropoiquilocitosis hereditaria (PPH). Es un trastorno grave y poco frecuente que se hereda de forma autosómica recesiva. El diagnóstico se realiza en la primera infancia de niños de ascendencia africana, que presentan anemia microcítica y anisopoiquilocitosis severa. La causa del defecto son mutaciones homocigóticas o heterocigotas compuestas, que afectan al gen de la α-espectrina y con menor frecuencia a la proteína 4.1R. Estas mutaciones conducen a una grave alteración en los dominios de auto asociación de los dímeros de espectrinas, anormalmente inestables a temperatura corporal. En la prueba de la estabilidad térmica de la membrana, los eritrocitos de pacientes con PPH, se fragmentan casi por completo cuando se incuban a 46 °C, mientras que los GR normales (espectrina normal) y los de ELH no lo hacen hasta que alcanzan los 49 °C (figura 23-9).

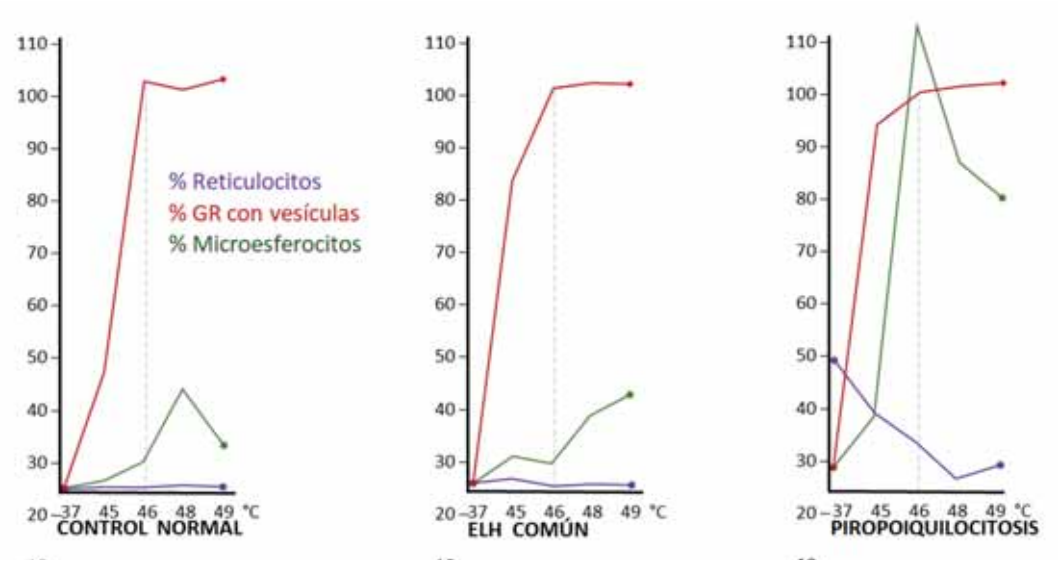


Figura 23-9. Prueba de la estabilidad térmica de la membrana eritrocitaria o prueba de la piropoiquilocitosis. Se muestra la proporción de eritrocitos con vesículas en la membrana (línea roja), proporción de microesferocitos (línea verde) y recuento de reticulocitos (línea azul) en un control normal, paciente con ELH común y paciente con piropoiquilocitosis.

ELH esferocítica, es un tipo poco común, se presenta en pacientes de ascendencia europea. Aparentemente es una forma híbrida de ELH común y EH.

Ovalocitosis del Sudeste de Asia, condición restringida a población aborigen en zonas endémicas de malaria como Melanesia, Papúa Nueva Guinea, Malasia, Filipinas, Indonesia y el sur de Tailandia (prevalencia 2-25%) o descendientes directos provenientes de ella. El defecto es la deleción de 9 aminoácidos (400-408) de la proteína de la banda 3.

Fisiopatología. Las ELH se presentan alrededor de todo el mundo, pero es particularmente común en personas de ascendencia africana y mediterránea. La elevada prevalencia (2%) en regiones endémicas de malaria, como África Occidental, otorga un efecto protector frente al paludismo, donde es o ha sido endémico. Las mutaciones en la ELH se concentra en los genes de α-espectrina, β-espectrina, proteína 4.1R, banda 3, glicoforina C y otras proteínas (tabla 23-7). Estas incluyen mutaciones puntuales, deleciones e inserciones, que afectan a los dominios de asociación de las espectrinas. El tipo y magnitud del defecto puede conducir a cambios eliptogénicos del CE del eritrocito transformándolo en eliptocito y/o micropoiquilocitos.

Clínica y laboratorio. La expresión clínica de la ELH es heterogénea, es así que la mayoría de los portadores heterocigotos con eliptocitosis son asintomáticos (sin anemia); mientras que las formas homocigotas o doble heterocigotas presentan eliptocitosis, hemólisis de severidad variable, reticulocitosis y niveles de Hp disminuidos. Los hallazgos clínicos y de laboratorio en la ELH común dependen del subtipo (tabla 23-8) y pueden ser complementados con ectacitometría (figura 23-10).

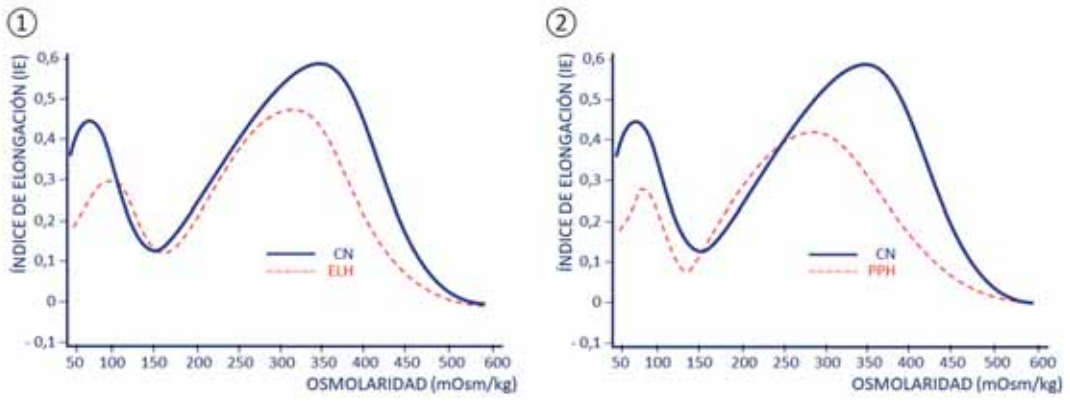


Figura 23-10. Ectacitometría en la eliptocitosis hereditaria. 1) eliptocitosis hereditaria común y 2) piropoiquilocitosis. Control normal (CN), eliptocitosis hereditaria común (EHL) y piropoiquilocitosis (PPH)

La PPH, es la forma clínica más grave de la ELH común; se presenta con hemólisis neonatal severa, retraso del crecimiento, enfermedad biliar, esplenomegalia y anomalías faciales. En sangre se observa típicamente microcitosis (<75 fL) y poiquilocitosis marcada con gran aumento de micropoiquilocitos; ocasionalmente se pueden identificar esferocitos, microesferocitos, dacriocitos y eliptocitos. La severidad del déficit de α-espectrina, correlaciona con la gravedad de la PPH y con la proporción de poiquilocitos de pacientes que la padecen. La esplenectomía, no suprime la hemólisis, aunque sí puede disminuir de forma relevante la anemia (figura 23-10).

La Ovalocitosis del sudeste de Asia (OSA), los pacientes presentan una delección de 9 aminoácidos en la banda 3, que da origen a un GR ovalado y de aspecto estomatocítico, pero mecánicamente estable. Todos los casos de OSA son heterocigotos para la mutación, por lo cual se cree que las formas homocigotas son incompatibles con la vida. Sorprendentemente, aun cuando el GR presenta estos cambios morfológicos, los individuos afectados, son asintomáticos o solo presentan hemólisis leve.

ELH esferocítica, es un híbrido entre la EH y la ELH común; ha sido descrita solo en individuos de ascendencia europea. En estos pacientes se observa hemólisis leve-moderada con esplenomegalia y presencia de esferocitos, ovalocitos, microesferocitos y microeliptocitos en sangre.

Tratamiento. Al igual que en la EH, la ELH carece de tratamiento curativo, pero una alta proporción de pacientes con AH crónica, severa y esplenomegalia, responden bien a la esplenectomía, aunque en menor grado que a la EH.

4.3. Hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN).

La HPN fue descrita en 1.882; se define como un síndrome de insuficiencia medular clonal, de origen adquirido. Afecta a la membrana de células hematopoyé-

ticas, al interferir con la primera reacción de la síntesis del glicofosfatidilinositol (GPI). La Síntesis de GPI se inicia en el retículo endoplásmico (RE), a través de diez reacciones enzimáticas secuenciales que se resumen a continuación (figura 23-11).

1. En la membrana externa del RE, el complejo enzimático PIG-A, PIG-C, PIG-H, PIG-P, GPI1, DPM2 y PIG-Y, transfiere N-acetilglucosamina (NAG) al Fosfatidilinositol (FI) generando NAG-FI,
2. La NAG del NAG-FI, es desacetilada por la enzima PIG-L formando GN-FI,
3. Traslocasas del RE transfieren el GN-FI a la membrana interna del RE,
4. El FI de la GN-FI, es acilado por la PIG-W generando GN-acil-FI,
5. Al GN-acil-FI se agregan secuencialmente tres moles de manosas, por tres distintas manosiltransferasas PIG-M/PIG-X, PIG-V and PIG-B,
6. El donante de manosas es el dolicol-fosfato-manosa, sintetizado en el citoplasma por el complejo enzimático DPM1, DPM2 y DPM3; posteriormente las manosas son transportadas al lumen del RE por el transportador SL15,
7. Posteriormente se transfieren tres moles de fofatidiletanolamina (FE) a cada una de las manosas, reacción que es catalizada por el complejo PIG-N, PIG-O/PIG-F y GPI7. PIG-F,
8. El grupo amida de la FE, une proteínas reguladoras a través de la GPI-transaminasa, generando proteínas ancladas al GPI. Esta reacción es catalizada por el complejo enzimático de la subunidad catalítica GPI8 formado por GAA1, PIG-S, PIG-T y PIG-U,
9. Las proteínas ancladas a GPI, siguen el tráfico exocítico del RE al Golgi, donde ocurren algunas modificaciones postraduccionales de las proteínas ancladas a GPI (PGAP2 y PGAP3) y
10. Posteriormente el complejo proteínas ancladas-GPI, se transportan a la membrana plasmática de progenitores y precursores hematopoyéticos.

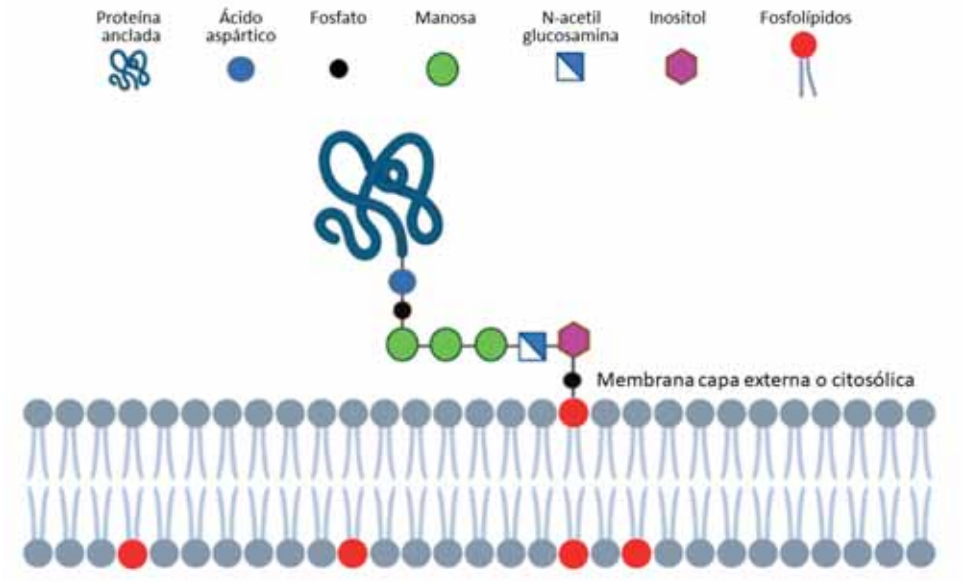


Figura 23-11. Estructura general del Glicofosfatidilinositol en la membrana externa o citosólica de células hematopoyéticas.

Fisiopatología. La exposición a radiaciones ionizantes, benceno, drogas o infecciones virales, generan mutaciones en el gen *PIGA* (Xp22.2) de las *stem cell* hematopoyéticas; este expresa la enzima fosfatidilinositol N-acetilglucosaminiltransferasa, que es parte del complejo que cataliza la primera reacción de biosíntesis de GPI. La disminución o ausencia de GPI impide la unión de las proteínas ancladas a GPI, entre ellas proteínas reguladoras del complemento CD55 y CD59 (figura 23-12).

Defectos moleculares en la HPN. Las mutaciones en el gen *PIGA*, en progenitores, precursores y células hematopoyéticas maduras, que conducen a HPN, generan disminución o ausencia de la síntesis de GPI y de las proteínas ancladas a él. El gen *PIGA* posee 6 exones y codifica para la enzima PIG-A, de 54 kDa y 484 aminoácidos (Uniprot) y forma parte del complejo enzimático PIG-C, PIG-H, PIG-P, GPI1, DPM2 y PIG-Y, el cual transfiere un mol de N-acetilglucosamina (NAG) al Fosfatidilinositol (FI) en el RE.

Estudios de NGS (Genbank NM_002641) identificaron 124 mutaciones en PIGA, 23 de ellas recurrentes, localizadas preferentemente en los exones 2, 5 y 3. Aproximadamente la mitad de los pacientes presentan una mutación, el resto, presenta dos a tres mutaciones (un caso con siete mutaciones). Las mutaciones *nonsense* son las más frecuentes (70% de los casos), mientras que las *missense* representan la proporción menor (30%)

Las mutaciones en el gen *PIGA*, interfieren con la síntesis total o parcial del GPI, que al mismo tiempo inhibe en la misma magnitud la expresión de numerosas proteínas ancladas a GPI (figura 23-12).

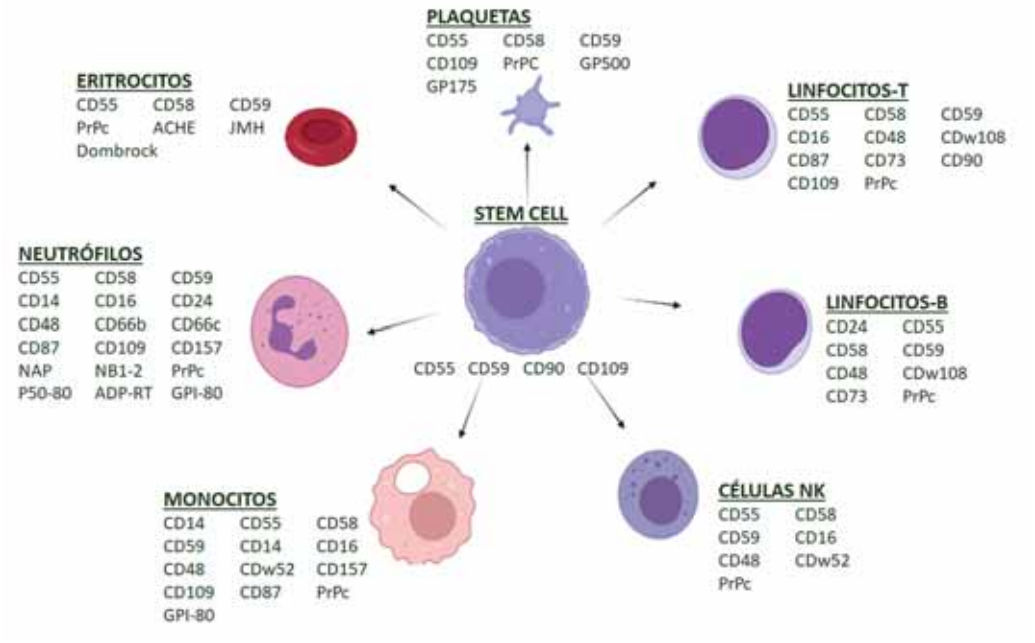


Figura 23-12. Proteínas ancladas a GPI en células hematopoyéticas.

Las mutaciones en el gen PIGA, impide la unión del GPI a proteínas reguladoras del complemento, que se expresan en la membrana de células hematopoyéticas (figura 23-12). Entre estas proteínas, se encuentran: CD59 (MIRL, *Membrane Inhibitor of Reactive Lysis*) y CD55 (DAF, *Decay Accelerating Factor*), ambos inhibidores fisiológicos de la activación del complemento. El déficit de estas proteínas en pacientes con HPN, favorece el efecto lítico, del complejo de ataque a la membrana (CAM) produciendo citopenias de grado variable, hemólisis y activación de la hemostasia entre otros efectos.

- CD55, inhibe la C3 convertasa; interviene en el control de la activación del complemento en la superficie celular. Su defecto favorece la acción citolítica de la fracción C3b activada sobre células hematopoyéticas.
- CD59, junto a la proteína S, inhibe la acción lítica del complemento al unirse a C5b, del complejo de ataque a la membrana (CAM); impidiendo la polimerización del poli-C9. Su defecto favorece la formación del CAM y el efecto citolítico sobre células hematopoyéticas.
- CD58, se expresa en linfocitos/monocitos y es un ligando para la molécula de adhesión CD2.
- CD14, se expresa en fagocitos e interviene en la respuesta inmune innata junto a TLR4.
- CD66, interviene en la función granulocítica.
- CD157, es un mediador de la adhesión y migración de granulocitos y monocitos.

De esta manera así, se entiende, que la expresión clínica de la HPN dependa del tipo de proteína anclada deficiente, de la magnitud de la disminución e importancia de su función y de los tipos celulares en que se deja de expresar.

Clínica y laboratorio. Es una enfermedad poco frecuente, afecta por igual a ambos géneros, se presenta a cualquier edad (promedio tercera década de vida) con una incidencia variable entre 1/100.000 a 5/1.000.000. La expresión clínica es también variable, desde pacientes que presentan escasa sintomatología y otros con cuadros severos e incapacitantes. La sobrevida media se encuentra en torno a los 10-15 años luego del diagnóstico (sin tratamiento).

Clasificación clínica. Se realiza en función del tamaño de clon, cuantificado a través de citometría de flujo en muestras de sangre y médula ósea, el *International PNH Interest Group* clasificó la HPN en tres grupos:

- **HPN clásica.** Los pacientes presentan déficit de CD55 o CD59 o GPI >50% en leucocitos. Presentan frecuente y persistentemente hemólisis intravascular, hemoglobinuria macroscópica y una elevada proporción de GR tipo III (déficit total de CD55 y CD59). El análisis de médula ósea es normal o muestra hiperplasia eritroide.
- **HPN asociada a síndromes de insuficiencia medular.** Estos pacientes presentan hemólisis intravascular leve-moderada o intermitente y está asociada a otros síndromes de insuficiencia medular como anemia aplásica (AA), síndrome mielodisplásico (SMD) o mielofibrosis. El análisis de médula ósea muestra signos de insuficiencia medular.
- **HPN subclínica.** Los pacientes presentan déficit de CD55 o CD59 o GPI <1% en leucocitos, pero sin evidencia clínica y bioquímica de hemólisis. El análisis de médula ósea es normal.

El curso natural de la enfermedad y su evolución se caracterizan por: 1) SH crónico, hemólisis intravascular y en raras ocasiones hemólisis paroxística con agudización nocturna, relacionados a infecciones, uso de medicamentos o transfusiones, 2) trombosis venosa, 3) síndrome de insuficiencia medular, y 4) defectos inmunes por infecciones de repetición.

- **Anemia hemolítica y hemoglobinuria.** La AH crónica intravascular (80% de los casos), produce hemoglobinuria (26% de los casos), especialmente en las mañanas, a su vez, genera hemosiderinuria y deficiencia de hierro que puede agravar el estado anémico. En pacientes con déficit aislado de CD55 no presentan hemólisis intravascular, por lo tanto, es el déficit de CD59, que determina la sensibilidad de los eritrocitos a la lisis por complemento; sin embargo, cuando estas dos proteínas están ausentes, la sensibilidad de las membranas celulares a la acción lítica del complemento, aumenta de manera significativa. La hemólisis crónica aumenta el depósito de hierro en el parénquima renal y provoca nefropatía crónica (en el 65% de los pacientes), hematuria y proteinuria que puede desencadenar insuficiencia renal crónica o insuficiencia renal aguda por necrosis tubular.
- **Trombosis y tromboembolismo.** Es una de las complicaciones más frecuentes, se presenta en aproximadamente la mitad de los pacientes, y constituye una causa importante de mortalidad (40-67% de los casos). La trombosis es principalmente venosas, característicamente recurrentes y de localización inusual (hepática, abdominal, visceral, intestinal, cerebral, cutánea); las trombosis arteriales son poco frecuentes (15%) y de localización cerebral y coronaria. La localización más frecuente y grave, es la trombosis de la vena hepática o síndrome de Budd-Chiari, que se presenta en el 15-30% de los pacientes. Los mecanismos trombogénicos, son producto de la activación plaquetaria y la hemólisis intravascular, que activa el complejo protrombinasa con liberación masiva de Hb. La Hb libre en el plasma une óxido nítrico (ON) que produce vasoconstricción, disfunción endotelial y liberación de radicales libres.
- **Insuficiencia medular.** El déficit de las proteínas reguladoras del complemento en las *stem cell* y en cada una de las líneas celulares hematopoyéticas puede explicar que, algunos pacientes desarrollen un síndrome de insuficiencia medular. En este sentido existe una estrecha relación entre la HPN y anemia aplásica, que desarrollan cierto grado de insuficiencia medular y citopenias en médula ósea; aun cuando los recuentos celulares en sangre son normales.
- **Infecciones.** Las infecciones se producen por neutropenia o por defectos funcionales en los granulocitos por déficit de proteínas ancladas a GPI (CD14-TLR4). Infecciones leves podrían exacerbar el proceso hemolítico y conducir a crisis aplásicas. Los defectos funcionales a nivel del sistema linfocitario son menos frecuentes.

Laboratorio. Dependiendo del tipo de HPN, el paciente puede presentar anemia, leucopenia y trombocitopenia de intensidad variable. La anemia frecuentemente es normocítica normocrómica, pero si existe déficit de hierro asociado puede ser microcítica-hipocrómica. Los reticulocitos se encuentran elevados en la forma clásica; pero en la insuficiencia medular, se encuentran disminuidos. La evaluación de la hemólisis intravascular (test de antiglobulina negativo) requiere la cuantificación de la LDH, muy elevada en la forma clásica, mientras que, en otros tipos

se encuentra normal o levemente aumentada. Otros análisis, muestran bilirrubina y hemosiderinuria elevada y Hp disminuida. NT-ProBNP (N-terminal pro-*brain natriuretic peptide*) es un marcador de la resistencia vascular pulmonar y de la función ventricular derecha, ambos indicadores de hipertensión pulmonar. Casi la mitad de los pacientes con HPN posee niveles elevados de NT-proBNP.

El mielograma, es otra prueba diagnóstica y muestra hiperplasia de la serie eritrocitaria, hipoplasia o aplasia. El análisis del mielograma debe incluir tinción de Perls y, en determinados casos, es recomendable realizar un análisis citogenético y biopsia medular.

Durante años, se utilizó el test de Ham, sucrosa y sus variantes, en el diagnóstico de la HPN, sin embargo, su baja E y S, hace recomendable hoy la cuantificación de proteínas ancladas a GPI como CD55, CD59 y del propio GPI (aún más específico para el diagnóstico) a través de citometría de flujo. El análisis se realiza en sangre y en una primera etapa se centra en detectar el déficit de la expresión GPI utilizando la aerolisina-FLAER, CD16, CD24, y CD66b en granulocitos neutrófilos (gate en CD45-CD10) y adicionalmente CD14, CD64 y CD157 en monocitos (figura 23-13). En el caso de detectar déficit de proteínas ancladas a GPI, se realiza una segunda etapa, para detectar el déficit de CD55 y CD59 en eritrocitos (gate en CD235) de pacientes que no han recibido transfusiones de GR recientemente.

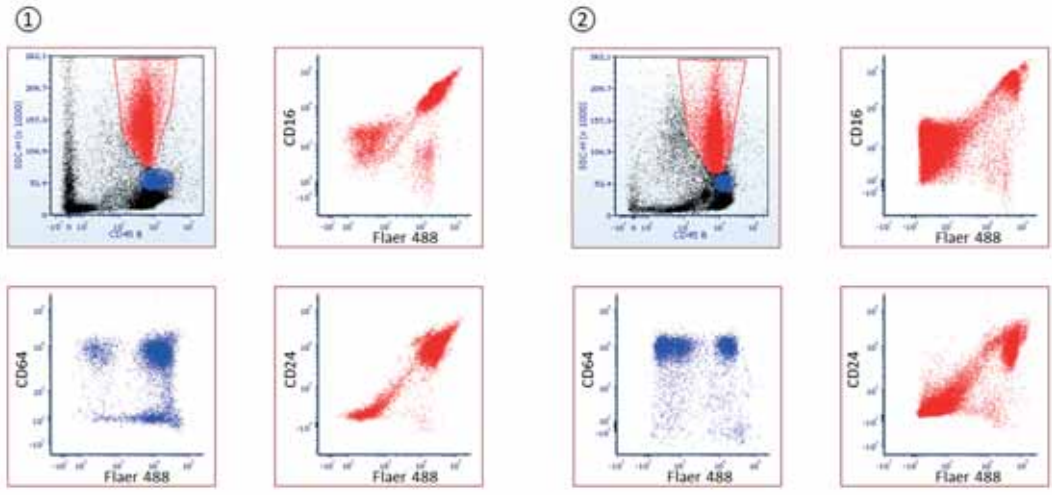


Figura 23-13. Representación parcial del análisis por citometría de flujo, de la expresión de la aerolisina Flaer y proteínas ancladas a GPI en pacientes con hemoglobinuria paroxística nocturna. 1) Paciente 1: gate región de los granulocitos neutrófilos (rojo) para la expresión de la aerolisina Flaer y proteínas ancladas a GPI CD16, CD24; gate región de los monocitos (azul) Flaer/CD64 en todos ellos se observa una población con expresión débil de Flaer y proteínas ancladas a GPI. 2) Paciente 2: Se observa una población de granulocitos neutrófilos y monocitos negativa para Flaer y proteínas ancladas a GPI.

Otros estudios. Permiten determinar el compromiso sistémico de la enfermedad e incluyen ecografía Doppler abdominal, ecocardiografía Doppler y frente

a evidencia de hipertensión pulmonar angiotomografía computadorizada (TC) pulmonar. En caso de síntomas neurológicos resonancia magnética (RM) craneal o angio-TC craneal. Evaluación por RM de hierro hepático y renal que son consecuencia de la hemólisis crónica y la hemosiderosis transfusional.

Tratamiento. Actualmente se considera la HPN como una enfermedad sistémica que puede afectar simultáneamente a varios órganos (riñón, hígado, pulmón, sistema nervioso central, corazón). El principal objetivo del tratamiento es reducir la hemólisis y minimizar el riesgo de complicaciones sistémicas.

Los pacientes requieren soporte transfusional en caso de anemia severa/sintomática y trombopenia. Se recomienda el uso de GR leucodepletados, para evitar reacciones inmunes contra antígenos leucocitarios que puedan activar el complemento y exacerbar la hemólisis. La suplementación con ácido fólico/B12 y hierro, permite compensar el aumento de la eritropoyesis y las pérdidas por hemoglobinuria y hemosiderinuria respectivamente. Se recomienda el empleo de anticoagulantes orales (INR 2.0-3.0) a partir del primer episodio de trombosis o como profilaxis de tromboembolismo venoso (requiere evaluar el riesgo de hemorragia). El tiempo de trombo-profilaxis es al menos por un año para poder evaluar la presencia o ausencia de eventos trombóticos durante la evolución. Eritropoyetina, puede reducir la necesidad de transfusiones de sangre; sin embargo, en algunos casos, podría empeorar los síntomas por reagudización de la hemólisis y el aumento de la producción de GR con déficit de CD55 y CD59.

Inhibidores del complemento. Se utilizan anticuerpos monoclonales humanizados, como Eculizumab y Avulizumab que bloquean selectivamente la fracción C5 del complemento e impide la formación del CAM. Esta terapia, ha aumentado la sobrevida y la calidad de vida de los pacientes, comparable a la de la población general según edad y género. El uso de esta estrategia terapéutica disminuye la hemólisis, el riesgo de trombosis (disminuye en un 85%) y la necesidad de transfusiones. Los síntomas derivados de la disfunción del músculo liso ocasionados por la disminución del ON, también mejoran. Se sugiere que los pacientes sean vacunados contra meningococo, al menos 2 semanas antes de recibir la primera dosis de Eculizumab. La suspensión del tratamiento puede provocar una hemólisis aguda y grave, debido al incremento de la proporción de eritrocitos, clase III durante el tratamiento. El trasplante de progenitores hematopoyéticos es el único tratamiento curativo; utiliza esquemas de acondicionamiento de intensidad reducida lo que permite disminuir la morbimortalidad; de todos modos, el procedimiento se reserva para aquellas formas clínicas con mal pronóstico, como son las asociadas a insuficiencia medular grave.

4.4. Alteraciones en la composición de lípidos de la membrana eritrocitaria.

La neuroacantocitosis, es un grupo de enfermedades poco frecuentes, que presentan alteraciones en la composición de lípidos en la membrana de GR, acantocitosis en sangre y neuropatía periférica. Los tipos de neuroacantocitosis son

abetalipoproteinemia, síndrome de McLeod, enfermedad de Huntington tipo 2, coreoacantocitosis, y neurodegeneración asociada a pantotenato quinasa.

Abetalipoproteinemia (ABLP) o enfermedad de Bassen-Kornzweig. Es una enfermedad poco frecuente, con herencia autosómica recesiva, acantocitosis y alteraciones neurológicas severas (ataxia espinocerebelosa, polineuritis y retraso mental). Se presenta en la primera infancia por déficit en la síntesis de lipoproteínas que contienen apo-B. La causa, son mutaciones en el gen *MTTP* que expresa la proteína MTP (*Microsomal Triglyceride Transfer Protein*) de enterocitos y hepatocitos, necesaria para secreción intestinal y hepática de las lipoproteínas que contienen apo-B. La limitada secreción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) desde el hígado facilita el depósito de triglicéridos y el desarrollo de hígado graso. Sin apo-B, el transporte de triglicéridos desde el intestino al hígado está bloqueado produciendo esteatorrea e hipocolesterolemia (< 50 mg/dL). Los lactantes presentan desde el primer mes de vida, esteatorrea, diarrea y malabsorción de vitaminas liposolubles (D, A, K y E). Otras manifestaciones son, ceguera por retinosis pigmentaria, arritmias cardiacas y miopatía. Las manifestaciones oculares y neuromusculares parecen ser secundarias a defectos en el transporte de vitamina E. La ABLP, requiere diagnóstico y tratamiento precoz, con manejo nutricional y suplementación con vitaminas liposolubles; la sobrevida de pacientes sin tratamiento es de 30 años.

En condiciones fisiológicas la composición de los lípidos de membrana del GR, están en equilibrio con el contenido de los mismos en las lipoproteínas plasmáticas. La esfingomielina (EM) es un fosfolípido estable e invariable en la membrana de GR, en la ABLP, aumenta de manera considerable la proporción de EM en ciertas áreas, de la membrana externa del GR, que protruyen y dan origen a los acantocitos (50-90% de acantocitos en sangre); no obstante, sus progenitores y precursores eritroides presentan morfología normal. Las prolongaciones de la membrana externa del eritrocito (irreversibles) aumentan gradualmente a medida que avanza el tiempo en circulación de los GR., pero sin efectos en las interacciones verticales y horizontales; no obstante, el acantocito presenta una leve pérdida de la capacidad de deformabilidad, que genera un atrapamiento/acondicionamiento esplénico mínimo y por lo tanto hemólisis leve.

Síndrome McLeod. Es producto de mutaciones en el gen XK y se hereda ligada al cromosoma X (Xp21.1). La ausencia de proteína XK en la membrana eritrocitaria, conocida como fenotipo McLeod reduce de la expresión de antígenos, del grupo sanguíneo Kell. Con frecuencia se observa anemia hemolítica, acantocitosis, dacriocitos y micropoiquilocitos. Los pacientes desarrollan miopatía subclínica y neuropatía como arreflexia, distonía, movimientos coreiformes y síntomas psiquiátricos-cognitivos. Otros síntomas son miocardiopatía dilatada y arritmias. No existen actualmente tratamientos curativos; su manejo es sintomático, irremediablemente progresivo y con pronóstico desfavorable.

Huntington tipo 2 (HDL2). Afecta principalmente a pacientes de ascendencia Africana, posee un patrón de herencia autosómico dominante y se manifiesta

típicamente en la tercera década de vida. Las manifestaciones psiquiátricas es el signo inicial, al que posteriormente se agrega corea, parkinsonismo o distonía. Las imágenes cerebrales muestran atrofia estriatal marcada y atrofia cortical moderada, similar a la enfermedad de Huntington. Los pacientes con HDL2 tienen expansiones de trinucleótidos CTG/CAG de 41-59 tripletes en el gen *JPH3* (16q24.3) que codifica para la proteína junctofilina 3. La acantocitosis podría estar relacionada con la función de proteínas quinasas, en el reordenamiento del CE de la membrana. No existen actualmente tratamientos curativos; su manejo es sintomático, irremediablemente progresivo y con pronóstico desfavorable.

Coreoacantocitosis. Es una enfermedad autosómica recesiva, presenta mutaciones en el gen *VPS13A* (9q21) que codifica para Coreína (se desconoce su función), está caracterizado por acantocitosis, concentración de lipoproteínas normales y manifestaciones neurológicas variables que pueden incluir convulsiones, corea, discinesia, protrusión de la lengua, disartria, atrofia muscular, hipotonía y mordedura involuntaria de lengua y labios. Se han identificado defectos en la fosforilación de las proteínas de membrana de GR (quinasas) que se relacionan con la formación de acantocitos. No existen actualmente tratamientos curativos; su manejo es puramente sintomático, implacablemente progresivo y con pronóstico desfavorable.

Neurodegeneración asociada a pantotenato quinasa. Se produce por mutaciones en el gen *PANK2* (20p12.3), que expresa la enzima mitocondrial pantotenato quinasa. La enzima regula la biosíntesis de acil-CoA, que interviene en la biosíntesis/oxidación de ácidos grasos, y descarboxilación oxidativa del piruvato previo al inicio del ciclo de Krebs. El déficit daña el metabolismo de ácidos grasos y energético. Al mismo tiempo se acumula cisteína, que actúa como quelante de hierro, acumulándose en neuronas, microglia y astrocitos; que dan origen a las lesiones cerebrales con pérdida de neuronas y fibras mielínicas.

Acantocitosis adquiridas. Se presentan en la enfermedad hepática avanzada, hepatopatías obstructivas y colestasis intrahepática. A diferencia de la ABLP, los acantocitos presentan mayor proporción de colesterol en la membrana, son menos deformables y por lo tanto son mayormente retenidos y destruidos en el bazo por acondicionamiento o atrapamiento esplénico. El resultado es anemia hemolítica extravascular moderada-severa o síndrome de Zieve en caso de hepatopatía alcohólica.

La membrana del GR posee una proporción 2,4:1 de colesterol/fosfolípidos. En la cirrosis avanzada, el hígado produce HDL, con elevada concentración de colesterol no esterificado, que es transferido a la membrana del GR por aumento de sales biliares. El exceso de colesterol en la membrana lo transforma en codocito, que el bazo remodela continuamente, produciendo una población en sangre de acantocitos esferoidales con prolongaciones de membrana cortas y extremo aguzado.

Los codocitos también se observan en pacientes con déficit de lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT), una enfermedad poco frecuente, que se hereda de forma autosómica recesiva. En condiciones fisiológicas la enzima circula en plasma unida a HDL, para formar ésteres de colesterol. El déficit de LCAT es producto de mutaciones en el gen *LCAT* (16q22.1) que compromete la función catalítica de la enzima. Las manifestaciones clínicas incluyen anemia hemolítica leve, opacidades corneales, hiperlipidemia, enfermedad renal y aterosclerosis a edad temprana. El déficit de LCAT aumenta al doble la concentración normal de colesterol no esterificado en la membrana del GR, aumenta la concentración de FC, mientras que la EM y la FE se reducen. El análisis de médula ósea y bazo, muestra células espumosas e "histiocitos azul marino" con alto contenido de colesterol no esterificado y PC.

4.5. Alteraciones en el trasporte de iones.

Son alteraciones congénitas, poco frecuentes, con herencia autosómico dominante, que afectan la permeabilidad de la membrana a cationes intracelulares. El desequilibrio en el contenido intracelular de Na+/K+ en el eritrocito, es compensado por el transporte de agua a través de su membrana, lo cual produce cambios fenotípicos característicos en el eritrocito.

Estomatocitosis hereditaria (hidrocitosis congénita o hereditaria con eritrocitos hiperhidratados). Es una enfermedad caracterizada por déficit de estomatina (regulador de canales iónicos) o por mutaciones *missense* en la proteína RhAG; se manifiesta con anemia hemolítica, reticulocitosis, estomatocitosis (5-50%) y bilirrubina elevada. Los eritrocitos presentan aumento de la permeabilidad a cationes; en particular la concentración de Na+ intracelular, es extremadamente alta (15-40 veces lo normal), mientras que la de K+ está disminuida. El aumento intracelular del catión, es compensado parcialmente por el eritrocito, movilizando agua, desde el plasma al medio intracelular, mecanismo que lo transforma en estomatocito. El ingreso de agua en el eritrocito provoca un aumento leve del VCM (>105 fL) y de la FOE; con disminución de la CHCM (<28 g/dL) y de su capacidad de deformabilidad; cambios que también son detectados por ectacitometría (figura 23-14).

En la estomatocitosis, los transportadores de cationes monovalentes (bomba de Na+/K+ ATPasa y cotransportador de K+/Cl−) son hiperestimulados por la elevada concentración de Na+ intracelular. La bomba Na+/K+ al tratar de expulsar el Na+ en exceso, consume todo el ATP, lo cual junto con la disminución de su capacidad de deformabilidad, son retenidos y destruidos en el bazo, por acondicionamiento esplénico (AHE leve-moderada).

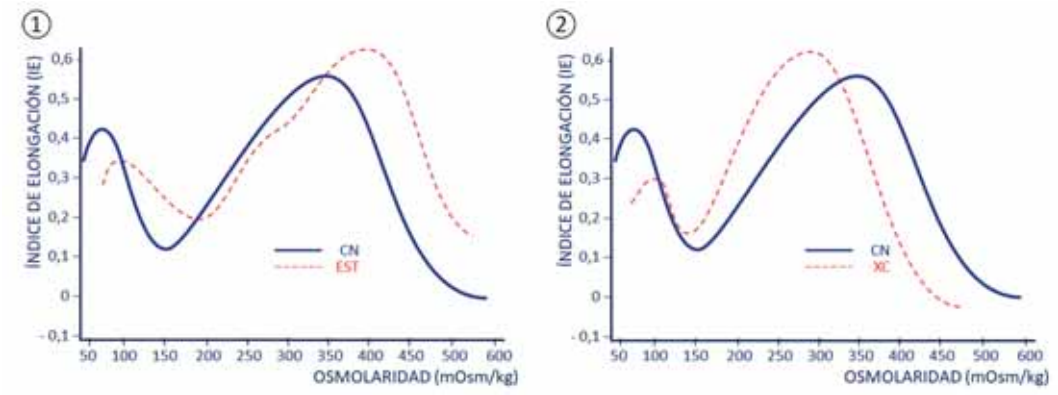


Figura 23-14. La ectacitometría de gradiente osmótico en estomatosis hereditaria (EST) y xerocitosis hereditaria (XC). 1) Estomatosis hereditaria. El desplazamiento del índice de elongación (IE) mínimo, en la región hipotónica de la curva, indica disminución de la relación superficie/volumen. El IE máximo elevado, se debe al aumento del VCM, y el IE en la región hiperosmolar (donde el IE alcanza la mitad de su valor máximo), aumenta en GR sobrehidratados. 2) Xerocitosis hereditaria. El IE mínimo, se desplaza significativamente hacia la izquierda por aumento de la relación superficie/volumen, en GR deshidratados y el IE en la región hiperosmolar (donde el IE alcanza la mitad de su valor máximo), disminuye considerablemente en GR deshidratados.

Criohidrocitosis. Se divide en dos tipos 1) tipo 1. Eritrocitos con estomatina normal y mutaciones missense en el gen SLC4A1 (banda 3). Es un tipo poco frecuente de estomatosis hereditaria, se hereda de forma autosómica dominante y presenta un comportamiento clínico y de laboratorio similar a la estomatosis hereditaria leve. El déficit aumenta la permeabilidad a cationes en el eritrocito, inducido por bajas temperaturas (<20°C en muestras almacenadas), que producen su hemólisis al exceder su capacidad de compensación. 2) tipo 2. Los eritrocitos presentan déficit de estomatina y mutaciones en el gen SLC2A1 (transportador GLUT1). Es similar al tipo 1, excepto por el predominio de eritrocitos de morfología normal, que se acompañan de escasos estomatocitos y equinocitos. Las mutaciones en el transportador Glut1 son la causa de las manifestaciones neurológicas, la hemólisis y cataratas que se deben al aumento de la permeabilidad catiónica.

Fitoesterolemia. Es una enfermedad autosómica recesiva poco frecuente, que presenta aumento de fitoesteroles en sangre y tejidos. Los hallazgos clínicos incluyen xantomas, artralgias y aterosclerosis prematura. Las manifestaciones hematológicas incluyen AH con estomatocitosis y macrotrombocitopenia. La enfermedad está causada por mutaciones en los genes ABCG5 (2p21) y ABCG8 (2p21) que codifican dos trasportadores intestinales de esteroles, esterolina-1 y esterolina-2 respectivamente.

Xerocitosis congénita o hereditaria (XC) o estomatosis hereditaria deshidratada. Es la alteración más frecuente de la permeabilidad a cationes (prevalencia 1:50.000), se produce por mutaciones *missense* en el gen *PIEZO1* y *KCNN4* (tabla 23-6), se heredan de forma autosómica dominante y causa un incremento leve, de la permeabilidad al potasio, suficiente para disminuir su concentración intracelular y producir hiperkaliemia. El eritrocito compensa parcialmente, el aumento del potasio extracelular, movilizando agua desde el citoplasma al plasma, lo cual causa su deshidratación y lo transforma en xerocito. El cambio morfológico en el eritrocito aumenta la rigidez de la membrana, causa atrapamiento esplénico y hemólisis extravascular moderada-severa. El hemograma revela hallazgos inespecíficos, como aumento de la CHCM, reticulocitosis y leves cambios en la morfología eritrocitaria: estomatocitos, codocitos y xerocitos. La ectacitometría de gradiente osmótico (figura 23-14), puede contribuir significativamente al diagnóstico, pero la confirmación diagnóstica requiere demostrar los defectos moleculares.

5. ERITROENZIMOPATÍAS

Los eritrocitos maduros, desprovistos de núcleo, mitocondrias, ribosomas y otros organelos, no tienen capacidad de síntesis de proteínas/enzimas o fosforilación oxidativa, de esta manera la producción de energía para satisfacer el metabolismo eritrocitario normal, depende de la vía glicolítica y de las enzimas sintetizadas en la etapa de eritroblastos.

Las eritroenzimopatías (EZ) son enfermedades poco frecuentes, que afectan a las enzimas de las vías metabólicas del eritrocito; algunas por su mayor incidencia y expresión clínica hematológicas (sindrome hemolítico) y no hematológicas (neurológicas o neuromuscular) poseen mayor interés clínico.

El sindrome hemolítico en las EZ se define como una anemia hemolítica congénita no esferocítica (AHCNE) con FOE normal en sangre fresca, respuesta parcial a la esplenectomía y por un patrón de herencia mayoritariamente autosómico recesivo. Otras manifestaciones hematológicas de las EZ son: cianosis, metahemoglobinemias o policitemias, que depende la vía metabólica afectada (figura 23-15).

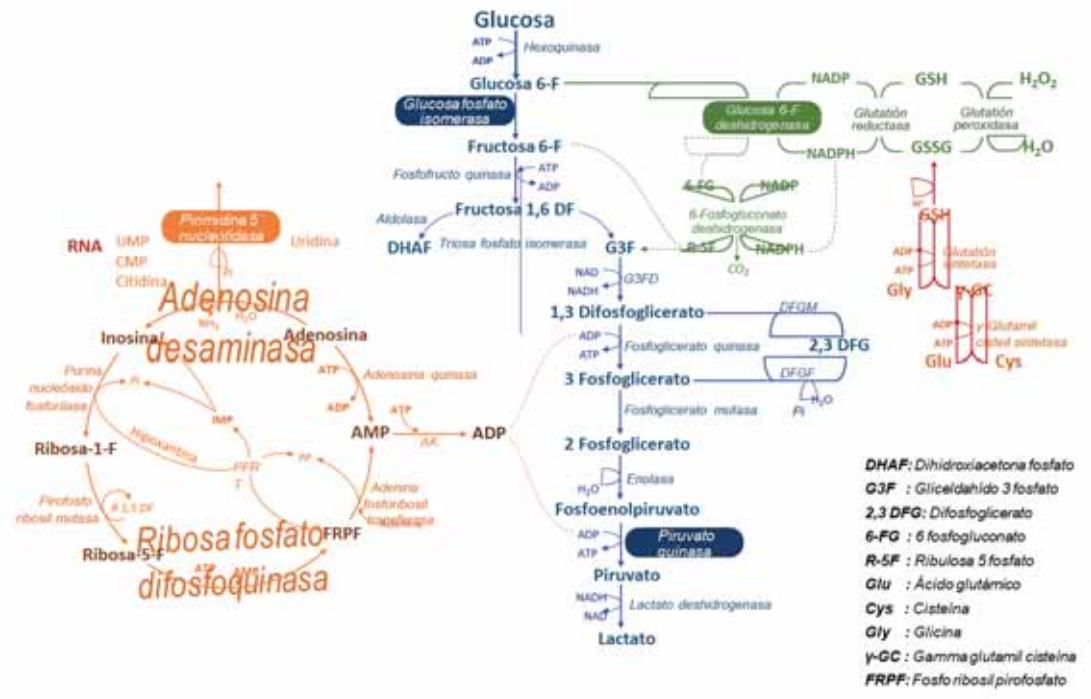


Figura 23-15. Vías metabólicas integradas en el eritrocito maduro. Se destacan en cada vía metabólica las eritroenzimopatías más frecuentes a nivel mundial, déficit de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, piruvato quinasa, glucosa fosfato isomerasa y pirimidina 5'nucleotidasa.

Las causas más frecuentes de EZ son el déficit de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (*G6PD*), déficit de Piruvato quinasa (*PKLR*) y déficit de pirimidina 5'nucleotidasa (*NT5C3A*). Otras enzimopatías, como el déficit de Hexoquinasa (*HK1*), de Fosfofructoquinasa (*PFKM*), de Fosfoglicerato quinasa (*PGK1*), triosa fosfatoisomerasa (*TPI1*) o de enzimas relacionadas con la síntesis del glutatión (GSH) son EZ muy poco frecuentes.

A nivel de diagnóstico de laboratorio, no se han desarrollado métodos instrumentales de aplicación masiva que permitan diagnosticar de manera inequívoca las EZ. La estrategia diagnóstica es entonces el diagnóstico diferencial con otras causas de AH, entre ellas AHI y AHE, antes de ejecutar pruebas enzimáticas específicas (tabla 23-9) y/o medición de intermediarios metabólicos. Actualmente también se recomienda el uso de NGS para detectar mutaciones en las enzimas de las vías metabólicas del eritrocito, las que se han relacionado previamente con: aumento o disminución de su actividad, menor síntesis o inestabilidad de las mismas (tabla 23-6).

Tabla 23-9. Pruebas *in vitro*, para caracterizar eritroenzimopatías.

Vmax	Velocidad máxima de la enzima a concentraciones saturantes de sustrato†
Km	Concentración de sustrato donde se obtiene la mitad de la *Vmax* †
pH óptimo	pH al cual la enzima, presenta la máxima actividad†
Estabilidad térmica	Resistencia de la enzima/proteína a la desnaturación por calor
Movilidad electroforética	Localización y posición de migración de la enzima/proteína en un campo eléctrico
Actividad específica	Es el número de unidades de enzima por miligramo de proteína (U/mg proteína) †

† Los resultados se deben interpretar considerando los antecedentes transfusionales previos de eritrocitos y la proporción de reticulocitos en pacientes con SH agudo los cuales presentan aumento de la actividad enzimática.

Las EZ, se agrupan dependiendo de la vía metabólica afectada: a) defectos en las enzimas de la vía glicolítica anaeróbica o vía de Embden-Meyerhof, b) defectos enzimáticos en el metabolismo oxido reductor y c) defectos enzimáticos en el metabolismo nucleotídico.

5.1. Eritroenzimopatías de la vía glicolítica anaeróbica

Las mutaciones en enzimas que ocupan una posición relevante en la vía, producen AH crónicas de intensidad variable, entre ellas se encuentra el déficit de: hexoquinasa (HK1), fosfofructoquinasa (*PFKM*) y piruvato quinasa (*PKLR*) o que intervienen en etapas críticas de la glicolisis como: glucosafosfato isomerasa (*GPI*), triosafosfato isomerasa (*TPI1*), y fosfoglicerato quinasa (*PGK1*) principalmente (tabla 23-10). Estas EZ, con excepción del déficit hereditario de fosfofructoquinasa y triosafosfato isomerasa, se acompañan de alteraciones neuromusculares de severidad variable.

Tabla 23-10. Características clínicas de las eritroenzimopatías de la glicolisis anaeróbica y su proporción del total de las eritroenzimopatías.

Eritroenzimopatías	% de las EZ	Herencia	Clínica
Piruvato quinasa	80–90%	AR	AHCNE moderada-severa
Glucosa fosfato isomerasa	3–5%	AR	AHCNE moderada-severa y déficit neurológico
Hexoquinasa	<1%	AR	AHCNE leve-severa
Fosfofructoquinasa	<1%	AR	AHCNE leve y miopatía
Aldolasa	<1%	AR	AHCNE leve-moderada y miopatía
Triosafosfato isomerasa	<1%	AR	AHCNE moderada-severa y déficit neurológico
Fosfoglicerato quinasa	<1%	Ligado-X	AHCNE leve-severa, déficit neurológico y miopatía

5.1.1. Déficit de piruvato quinasa

La piruvato quinasa (PK) cataliza una de las etapas más importantes de la glicolisis, al transformar el fosfoenolpiruvato (FEP) en piruvato con producción de un mol de ATP. La PK eritrocitaria (PK-R) y hepática (PK-L), se producen por *splicing* alternativo del gen *PK-LR* (1q21). Se han descrito más de 400 mutaciones diferentes en el gen *PK-LR* distribuidas a nivel mundial, 200 de ellas relacionadas con AH y herencia autosómica recesiva. El déficit de PK en eritrocitos, es un modelo de EZ, que produce detrimento energético y estimula su destrucción prematura por acondicionamiento esplénico. La localización de las mutaciones en el gen de la *PK-LR* es variable, lo cual explica la expresión fenotípica y distribución geográfica también variable del déficit.

- Mutación en 1529G>A (Arg510>Gln), frecuente en Estados Unidos y en el norte de Europa
- Mutación en 1456C>T (Arg484>Trp), frecuente en España, Portugal e Italia
- Mutación en 1468C>T (Arg490>Trp), frecuente en oriente
- Mutación en 1436G>A (Arg 479>His) en la población Amish
- Deleción de 1.149 pb, con pérdida del exón 11 en gitanos

Las variantes de PK, son proteínas/enzimas anormales, que difieren en sus propiedades físicas o cinéticas (tabla 23-9), sin embargo, existe baja o nula relación entre la actividad catalítica y la severidad de la hemólisis; en parte porque las condiciones del ensayo *in vitro* son distintas a las fisiológicas.

El déficit de PK, resulta en el uso deficiente de la glucosa y, por lo tanto, la disminución de: ATP, piruvato y lactato. El déficit, afecta también a otros intermediarios metabólicos, por ejemplo, aumenta hasta tres veces los niveles de 2,3-DFG, lo cual otorga al paciente una ventaja a las exigencias físicas (ejercicio) o a la hipoxia. Si bien el defecto principal del déficit, es la disminución de la síntesis de ATP; en pacientes con reticulocitosis, los niveles de ATP son normales o elevados, al ser generados por fosforilación oxidativa mitocondrial. Cuando los reticulocitos maduran, pierden las mitocondrias y por lo tanto disminuyen los niveles de ATP, descenso que conduce a una lesión celular irreversible, por activación de mecanismos dependientes de calcio intracelular (figura 23-2).

Laboratorio. El déficit de PK, causa SH de severidad variable, reticulocitosis (5-15%) y pseudo-macrocitosis. Las alteraciones morfológicas en los eritrocitos, no son distintivas, pero son las propias del SH: policromatofila, anisocitosis, equinocitos o acantocitos. Por esta razón, la confirmación diagnóstica del déficit, requiere de la cuantificación de la actividad de la PK, en eritrocitos leucodepletados. Los pacientes heterocigotos para el déficit, presentan un 5-25% de la actividad normal de la PK; mientras que los portadores heterocigotos, presentan el 50% de la actividad normal (asintomáticos), lo que dificulta el diagnóstico, por la superposición, con la actividad normal. Sin duda, las técnicas de diagnóstico molecular como NGS, han demostrado ser útil para el diagnóstico del déficit (tabla 23- 6).

Clínica. La deficiencia de PK, predomina en individuos de raza caucásica y afecta por igual a hombres y mujeres. La mayoría de los casos se diagnostican en la primera infancia en pacientes que expresan características clínicas variables, desde *Hydrops fetalis*/kernicterus, esplenomegalia, cambios óseos asociados a hiperplasia eritroide, cálculos biliares, hasta SH compensado. En caso de anemia, esta es bien tolerada, por el aumento de 2,3-DFG. Los pacientes pueden evolucionar con crisis aplásicas, en casos de infección por parvovirus B19 o embarazo.

Tratamiento. El déficit de PK puede requerir soporte transfusional o esplenectomía en casos de anemia severa; aunque, su eficacia es menor, a la observada en la EH. La esplenectomía permite disminuir la severidad de la anemia/bilirrubina y por lo tanto, los requerimientos transfusionales de la misma, paradojalmente post-esplenectomía, los reticulocitos aumentan a un 50-70%. En caso de SH crónico, con anemia moderada-severa, se recomienda la administración preventiva de ácido fólico, para evitar el agotamiento de las reservas por aumento de la demanda. Las crisis hemolíticas en el déficit de PK son poco frecuentes y no están relacionadas al uso de medicamentos.

5.1.2. Déficit de la Glucosafosfato isomerasa.

La Glucosafosfato isomerasa (GFI) es una enzima de la vía glicolítica que se expresa en distintos tejidos, con distintas isoformas. En el GR su función es exclusivamente enzimática, pero en otros tejidos, presenta funciones de hormona o tiene un rol como factor de crecimiento. En el tejido nervioso, la enzima presenta función de neuroleucina (NLK), un factor neurotrófico para neuronas espinales y sensoriales que, en pacientes con déficit, explica la afección neurológica asociada a la anemia.

Como la mayoría de las EZ de la glicolisis, el déficit de GFI se hereda de forma autosómica recesiva. Los pacientes heterocigotos son asintomáticos y muestran reducción del 50% de la actividad normal, por el contrario, los pacientes homocigotos compuestos o con más de una mutación, presentan AH desde el periodo neonatal, hiperbilirrubinemia e *Hydrops fetalis*, que frecuentemente requiere soporte transfusional. Las características morfológicas de los GR son similares a las observadas en el déficit de PK, entre ellos acantocitos, equinocitos, esferocitos, estomatocitos y reticulocitosis (pseudo-macrocitosis). Las crisis hemolíticas son poco frecuentes y están asociadas a infecciones o exposición a medicamentos.

5.1.3. Déficit de Hexoquinasa.

El déficit de Hexoquinasa (HK) produce AHCNE, se hereda de forma autosómica recesiva, en algunos casos el estado heterocigoto parece ser lo suficientemente grave para provocar AH. Los pacientes con déficit severo presentan hiperbilirrubinemia neonatal y pueden requerir soporte transfusional. En pacientes con enfermedad leve, presentan SH compensado, ictericia, reticulocitosis, litiasis biliar en la infancia y esplenomegalia. En el examen morfológico de los eritrocitos, no se observan sorprendentemente anormales. El tratamiento consiste en soporte transfusional, suplementación con folatos y controles regulares con imágenes

para detección de colelitiasis. La esplenectomía puede mejorar los niveles de hemoglobina, pero no elimina la anemia.

5.1.4. Déficit de Fosfofructoquinasa.

El déficit de fosfofructoquinasa (FFK) se clasifica en tipo I-V según: la subunidad de la enzima afectada (L o M), la magnitud del déficit y la expresión clínica (anemia hemolítica, miopatía o artritis). El déficit tipo I o enfermedad de Tauri, es el más frecuente, se hereda de forma autosómica recesiva y en los casos severos, puede comprometer la vida de recién nacidos. El diagnóstico se puede plantear, en pacientes con lactato plasmático disminuido, post prueba de esfuerzo isquémica (anaeróbica) en el antebrazo, pero no se puede prescindir de la confirmación del diagnóstico, a través de la cuantificación de la actividad de la FFK, en biopsia de tejido muscular. Cuando el déficit de FFK se limita a los eritrocitos, los pacientes presentan AH moderada-severa, ausencia de miopatía y lactato post prueba de esfuerzo normal. En general, los eritrocitos, no presentan alteraciones morfológicas características o marcadamente anormales, solo y ocasionalmente se puede observar punteado basófilo grueso. El tratamiento del déficit, considera suplementación con folatos y soporte transfusional.

5.1.5. Déficit de aldolasa.

La aldolasa se expresa en eritrocitos, músculo y tejido nervioso. Su déficit produce AHCNE. La expresión clínica de la deficiencia es variada e incluye retraso mental, miopatía y AH de intensidad variable.

5.1.6. Déficit de Triosa fosfato isomerasa.

La triosa fosfato isomerasa (TFI) cataliza la interconversión reversible de los isómeros triosa fosfato, dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehído 3-fosfato. El déficit de TFI, se produce por mutaciones en el gen (*TPI1*) las que se heredan de forma autosómica recesiva. Se han identificado catorce mutaciones diferentes, todas ellas por sustitución de una base nitrogenada. La mutación más frecuente es la sustitución G-C en el codón 104 (GAC-GAC) con cambio del glutamato por aspartato y que afecta la estabilidad térmica de la enzima. La deficiencia de TFI se caracteriza por AH crónica, reticulocitosis severa (>50%), acantocitos escasos y que dependiendo de la magnitud de la anemia puede requerir soporte transfusional. Otras alteraciones son ictericia neonatal, riesgo elevado de infecciones bacterianas, miocardiopatía y enfermedad neuromuscular progresiva que se inicia en el niño con espasticidad, retraso psicomotor, debilidad e hipotonía (déficit de TFI en tejido neuronal). Ocasionalmente, la enfermedad se estabiliza durante la niñez o adolescencia, pero en general la muerte ocurre antes de los 5 años. Los casos más severos se han relacionado con la acumulación de productos metabólicos como dihidroxiacetona fosfato, metilglioxal y de proteínas glicadas. Actualmente el tratamiento consiste en suplementación con folatos y soporte transfusional. Estudios *in vitro* en *Stem cell hematopoyéticas*, permiten recuperar la actividad de la TFI en tejido hematopoyético y en tejido nervioso.

5.1.7. Déficit de Fosfoglicerato quinasa.

La deficiencia hereditaria de Fosfoglicerato quinasa (FGK) es un trastorno ligado al sexo, que afecta mayoritariamente al hombre. Su presentación clínica es variable desde pacientes asintomáticos, AHCNE leve, miopatía o alteraciones neurológicas como convulsiones, trastornos del movimiento, retraso psicomotor, afasia o tetraplejía. En mujeres, la disminución de la actividad de la enzima en GR, es menos severa que en hombres.

5.1.8. Déficit de Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa.

En el déficit de gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (G3FD) es una enfermedad poco frecuente, su actividad disminuye al 20-50% de lo normal. En algunos casos el déficit produce anemia hemolítica o se coexpresa con EH. La severidad clínica del déficit es similar a la EH.

5.1.9. Déficit de 2,3 Difosfoglicerato mutasa.

La disminución o la ausencia de actividad de la 2,3 difosfoglicerato mutasa (DFGM) en eritrocitos, en general no afecta la fisiología ni la vida promedio de eritrocito. Se han descrito casos de policitemia por déficit de DFGM con niveles de 2,3 DPG indetectables. En caso de policitemia sintomática o si está asociada a otros factores de riesgo se sugiere tratar con flebotomías normovolémicas.

5.2. Eritroenzimopatías del metabolismo de las hexosas monofosfato

La derivación de la vía glicolítica, al metabolismo de las hexosas mono fosfatos (MHM) representa en condiciones normales o basales el 2%, del metabolismo de la glucosa, este provee suficiente NADPH para contrarrestar el daño oxidativo endógeno. La reserva del 98% se utiliza para proteger el eritrocito del daño oxidativo ($O_2^{\bullet -}$, $OH^{\bullet}$ y H_2O_2), inducidos por (1) medicamentos, (2) alimentos o ingesta de habas, (3) exposición o ingestión de químicos/venenos, (4) alteraciones congénitas que afectan la estabilidad de la hemoglobina o metabolismo eritrocitario y (5) respuesta a infecciones. El MHM es la única fuente de NADPH del eritrocito y que es necesario para mantener los niveles de glutatión reducido (GSH) protegiéndolo del daño oxidativo.

Cuando el NADPH, es insuficiente para contrarrestar el daño oxidativo, la Hb, proteínas estructurales del eritrocito y las enzimas del mismo provocan su desnaturalización, pierden su capacidad funcional y se inicia prematuramente la eriptosis que resulta en la hemólisis extravascular del eritrocito por acondicionamiento esplénico (figura 23-3). La EZ más frecuente del metabolismo oxido reductor y de gran importancia clínica, es el déficit de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6FD).

5.2.1. Déficit de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa.

El déficit de G6FD, es la EZ más frecuente en humanos, se estima que afecta a más de 400 millones de personas, equivalente al 5% de la población mundial.

El déficit predomina en zonas geográficas y grupos étnicos de África, Asia, Centroamérica y Europa, todas ellas zonas endémicas de malaria. El déficit, por un mecanismo parcialmente conocido, otorga resistencia a la malaria, al aumentar el estrés oxidativo y agotar el GSH, lo cual desencadena la destrucción extravascular del eritrocito, pero también del parásito.

La deficiencia de G6FD, se hereda ligada al X; los hombres padecen la enfermedad y las mujeres son portadoras; no obstante, en mujeres heterocigotas, la expresión clínica del déficit, puede variar desde un SH agudo con actividad mínima de G6FD, hasta pacientes asintomáticas con actividad de la enzima normal (fenómeno de Lyon). La enzima G6FD, presenta un elevado polimorfismo, entre ellos el más frecuente, es la variante G6FD B+, que es la enzima B normal. Todas las restantes variantes moleculares derivan de esta y se producen por mutaciones en alguno de los 13 exones del gen. Otra variante es la G6FD A+, variante también normal, que predomina en población de ascendencia africana y se diferencia de la G6FD B+ en solo un aminoácido.

Entre las variantes deficientes, destacan la G6FD mediterránea, la G6FD A− y la G6FD Cantón. La G6FD mediterránea (por su distribución geográfica), progresa con crisis hemolíticas por: ingesta de medicamentos (tabla 23-11), síndrome metabólico descompensado o consumo de habas (favismo) que es su manifestación clínica más frecuente. La variante G6FD A−, también se observa en población caucásica y de origen mediterráneo y al igual que la variante G6FD mediterránea, también desarrollan favismo.

Clínica y laboratorio. A medida que los GR normales envejecen, disminuye la actividad de la G6FD (vida media normal 62 días) pero mantiene un nivel suficiente, para producir NADPH y mantener la concentración de GSH, que permita contrarrestar el daño oxidativo endógeno en el eritrocito. En el caso de las variantes moleculares de G6FD inestables, presentan vidas medias disminuidas, lo cual correlaciona con la presentación clínica del déficit.

Tabla 23-11. Medicamentos y tóxicos que pueden desencadenar hemólisis severa o leve en pacientes con déficit de G6FD

	Hemólisis severa	Hemólisis leve
Antipiréticos	Acetanilida y acetofenetidina.	Aspirina
Sulfamidas y sulfonas	Sulfapiridina, sulfacetamida, salazopirina, salicilazosulfapirina, sulfametoxazol.	Sulfadiazina, sulfaguanidina, sulfamerazina, sulfametoxipiridazina.
Antimaláricos	Primaquina, pamaquina, dapsona y quinina.	Cloroquina, nitrofuranos y tafenoquina.
Nitrofuranos	Furazolidona	Nitrofurazona
Otros	Azul de metileno, naftaleno, henna, hierbas asiáticas, fenilhidrazina, azul de toluidina, ácido nalidíxico, dimercaprol, fenilbutazona, vitamina K, colchicina, mepacrina y estreptomicina.	Antazolina ácido ascórbico, cloranfenicol, isoniazida, L-DOPA, menadiona, a. paraaminobenzoico, probenecid, procaína, pirimetamina y trimetoprim.

En los pacientes con déficit de G6FD A−, la actividad de la enzima en reticulocitos es normal o elevada, pero luego declina rápidamente con su maduración, esta variante presenta una vida media de solo 13 días y se expresa clínicamente con SH crónico, leve y limitado a los eritrocitos con mayor vida media. En pacientes con la variante mediterránea (vida media horas), presentan mayor susceptibilidad al daño oxidativo que, se expresa con SH agudo/severo, fiebre, escalofríos, dolor abdominal o lumbar de aparición repentina y orinas oscuras por hemoglobinuria que no se debe confundir con coluria o mioglobinuria. Una proporción menor de pacientes presentan déficit y/o inestabilidad muy severa de la G6FD, ellos desarrollan AHCNE crónica, aún en ausencia de factores desencadenantes.

El daño oxidativo, en eritrocitos con déficit de G6FD, aumenta la oxidación de grupos sulfhidrilos de proteínas y enzimas, con pérdida de su función; en el caso de la Hb 1) se transforma en sulfahemoglobina o 2) se desnaturalizan sus cadenas de globinas, se oxida el hierro-Hem y dan origen a hemicromos o cuerpos de Heinz-Ehrlich (CH). Estas son inclusiones eritrocitarias, son moléculas de bajo spin en los que, el sexto enlace de coordinación del hierro-Hem, se une a radicales hidroxilos de aminoácidos en las cadenas de globina o bien, se une a los anillos, imidazol protonados o no, de residuos de histidina (figura 23-16).

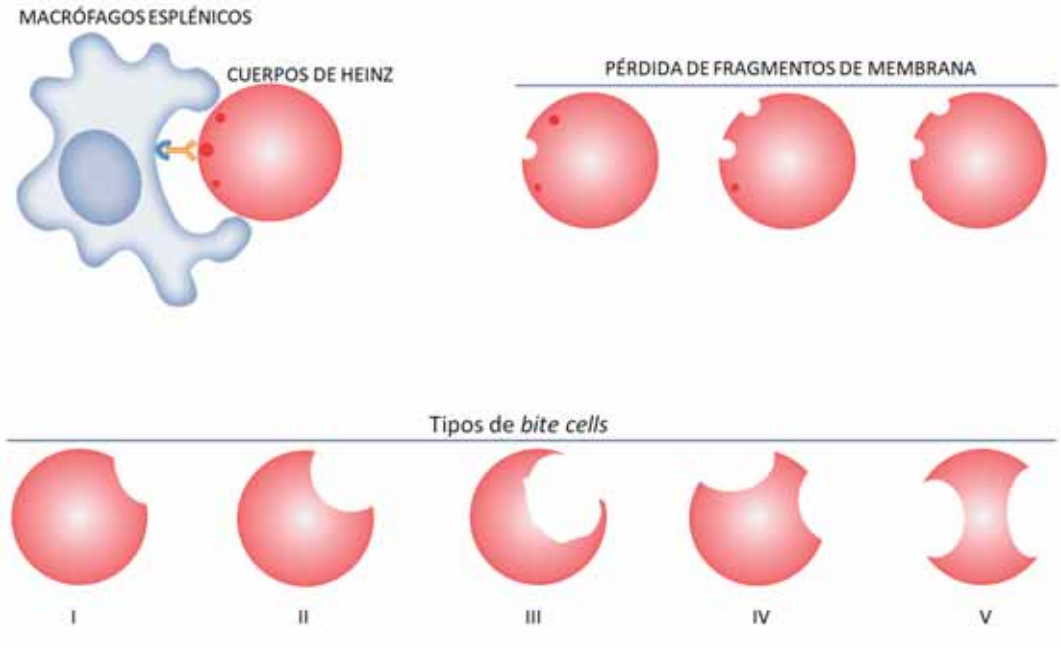


Figura 23-16. Cuerpos de Heinz-Ehrlich y clasificación de las *bite cells*. Los eritrocitos con pérdida de membrana simétrica (formas de "Apple core") o asimétricas son altamente sugerentes de anemia asociada a CH. Los *bite cells* tipo III, con gran pérdida de membrana, son indistinguibles de los queratocitos, en las anemias microangiopáticas.

Los CH, en el GR, se comportan como proteínas tóxicas o mal plegadas, que al colisionar con el dominio intracelular de proteínas de transmembrana, generan

cambios irreversibles en su estructura induciendo neoepitopos en el dominio extracelular. El sistema inmune, forma autoanticuerpos, contra estos neoepitopos, que luego son reconocidos por receptores para Fc en macrófagos esplénicos. Los macrófagos, remueven segmentos de la membrana del eritrocito y dan origen a los *bite cells*, clínicamente relevantes ya que su proporción, determina la tasa de hemólisis en el paciente (figura 23-16).

Otros efectos de los CH sobre los eritrocitos, es la activación del mecanismo de transporte de fosfolípidos a través de la membrana (*flip-flop*), con expresión de fosfatidilserina en la capa externa; esta es reconocida por macrófagos esplénicos induciendo su hemólisis. Al mismo tiempo la expresión de fosfatidilserina, activa la coagulación con producción de plasmina, que tiene la capacidad de activar el complemento e inducir la destrucción de los GR. Los CH finalmente precipitan y liberan el hierro. El hierro libre citoplasmático, a través de reacciones tipo Fenton, produce especies reactivas de oxígeno que deterioran aún más la estructura del eritrocito.

Favismo. Es la hemólisis aguda, que se presenta en algunos pacientes después del consumo o contacto con habas. Las variantes moleculares de G6FD y otras EZ que desarrollan favismo, presentan 1-2 días post exposición a habas, náuseas, vómitos, vértigo, ictericia, daño renal y SH agudo intravascular, moderado-severo, generalmente autolimitado (recuperación espontánea 2-6 días) y solo en ciertas ocasiones se requiere soporte transfusional. El efecto hemolítico de las habas, se atribuye a la metabolización de ciertas agliconas de pirimidina (vicina y convicina) por β-glucosidasas intestinales, que producen divicina e isouramilo, de elevado poder oxidante. La expresión variable del cuadro clínico, así como del efecto de las habas sobre el mismo individuo, se explica por la concentración de agliconas y el efecto de la temperatura de cocción en la preparación de esta legumbre.

Hemólisis inducida por exposición a fármacos oxidantes. En pacientes con déficit de G6FD, ciertos medicamentos pueden desencadenar hemólisis al aumentar la concentración intracelular de H_2O_2 y radicales libres (tabla 23-11). En algunos casos de hemólisis previamente atribuida a estos medicamentos pueden, de hecho, haber sido el resultado del tratamiento de infecciones en el paciente afectado. También se debe considerar que otros compuestos químicos (que no son fármacos) también pueden causar hemólisis en individuos con déficit de G6FD.

Hemólisis inducida por infección. La infección es probablemente la causa más frecuente que desencadena la hemólisis que, por lo general es leve y auto limitada. Se ha asociado a infecciones por salmonella, E. coli, estreptococos, rickettsias o virus hepáticos. Se ha teorizado, que el mecanismo de hemólisis, en GR deficientes en G6FD, se produce por oxidantes o radicales libres liberados al plasma, durante la fagocitosis de patógenos.

Ictericia neonatal. En recién nacidos con déficit severo de G6FD, la ictericia predomina sobre la hemólisis, la que se ha atribuido, a la transferencia a través de la placenta de la madre al hijo de medicamentos (sulfas), productos metabólicos de las habas consumidas previo al parto o vestuario o prendas del

RN, que han estado previamente en contacto con naftaleno. Generalmente, las variantes enzimáticas encontradas en estos pacientes son tipo mediterránea, Sudeste asiático, China y Cantón. La severidad del cuadro es variable, en casos graves puede llevar a kernicterus, con riesgo de discapacidad intelectual, parálisis cerebral, sordera y muerte. Es de interés indicar que el 30% de los casos de kernicterus en Estados Unidos, son atribuibles a déficit de G6FD.

Clasificación. La forma monomérica de G6FD contiene 515 aminoácidos y tiene un peso molecular de 59 KDa. La forma activa, es un dímero que requiere NADP para mantener su estabilidad. El gen de la G6FD (Xq28) posee 13 exones y tiene más de 18 kb de longitud. Por acuerdo internacional, se utilizan métodos bioquímicos para clasificar las variantes (tabla 23-9), las cuales actualmente ascienden a 400. Sin embargo, las diferencias bioquímicas entre algunas variantes, son sutiles y no necesariamente revelan diferencias clínicas verdaderas. Los análisis moleculares, han revelado que muchas variantes bioquímicas de G6FD, tienen el mismo defecto molecular y que en más del 85% de los casos son sustituciones de un nucleótido (mutaciones *nonsense*) que afectan principalmente el exón 10 (sitio de unión a NADP) y exón 6 (sitio de dimerización). El 8% son mutaciones múltiples (dos o más sustituciones); 5% deleciones y el 1% de mutaciones afectan a regiones no codificantes (figura 23-17).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica las variantes de G6FD, según la actividad residual de la enzima en eritrocitos y la severidad de la hemólisis (tabla 23-12). Los pacientes con variantes clase I, son las más frecuentes, presentan el déficit más grave y expresan AHCNE severa; esta se diferencia de las variantes clase II igualmente severas, por su evolución en periodos hemolíticos intermitentes. Por su parte, las variantes clase III, presentan un déficit moderado y hemólisis intermitente, desencadenado por infecciones o ingesta de medicamentos (figura 23-17), finalmente las variantes clase IV y V, actualmente carecen de interés clínico.

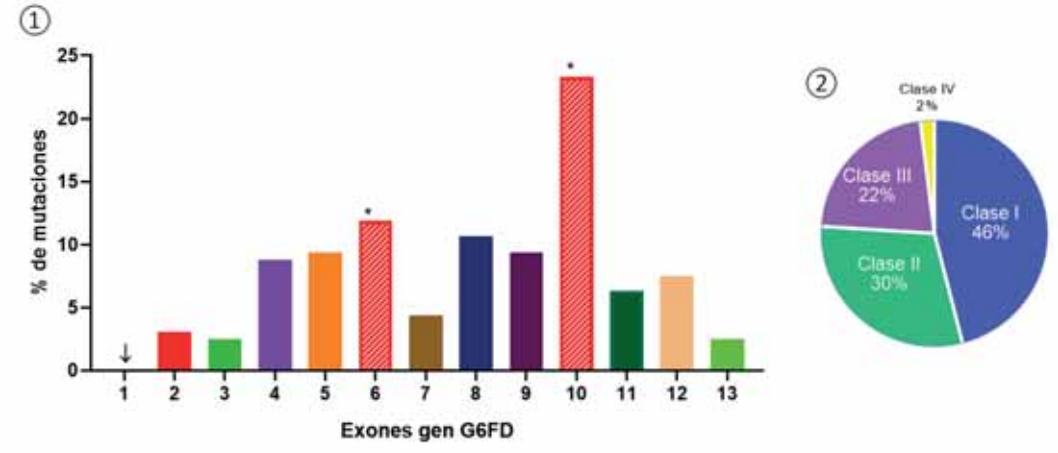


Figura 23-17. Mutaciones en el gen de la G6FD. 1) Distribución de las mutaciones en cada exón y proporción que representan. 2) Clasificación OMS de las clases de déficit. La mayor proporción de las mutaciones son de clase I y afectan principalmente los exones 6, 10 y 13.

Tabla 23-12. Clasificación OMS de las variantes de G6FD según su actividad en eritrocitos

Clase	Actividad de G6FD	Severidad de la hemólisis	Otros hallazgos clínicos
I	<10%	AHCNE severa, asociada con anemia hemolítica no esferocítica extravascular crónica	SH crónico, ictericia neonatal y ocasionalmente disminución de la función de leucocitos
II	<10%	AHCNE severa y episodios de anemia hemolítica aguda	Asintomático en pacientes estables. Hemólisis por exposición a compuestos oxidantes
III	10-60%	AHCNE moderada y episodios de anemia hemolítica aguda	Asintomáticos en pacientes estables y hemólisis por exposición a compuestos oxidantes
IV	60-100%	Ausencia de hemólisis	Paciente asintomático
V	>150%	Ausencia de hemólisis	Paciente asintomático

Como la mayoría de las mutaciones en la G6FD son asintomáticas, el número total de mutaciones podría ser probablemente mucho mayor que el indicado en este capítulo; solo los estudios moleculares masivos, determinarán, a futuro, la prevalencia exacta de las mutaciones en la población mundial (tabla 23-13).

Laboratorio. La expresión clínica del déficit abarca un amplio espectro de gravedad del SH. La expresión clínica más común, es el SH agudo, AHCNE, favismo e hiperbilirrubinemia neonatal. El SH agudo, se presenta posterior a la exposición de agentes oxidantes (tabla 23-11), infecciones o síndrome metabólico descompensado. Estos pacientes presentan síntomas y resultados de laboratorio característicos a las AH agudas: anemia normocítica normocrómica y anisopoiquilocitosis moderada-severa. El análisis morfológico de los eritrocitos muestra esferocitos, *bite cells*, pre-queratocitos (*blister cells* y excentrocitos) y queratocitos (figura 23-16). La naturaleza aguda de la hemólisis, no produce reticulocitosis significativa, ya que se necesitan al menos 5 días para una respuesta reticulocitaria compensatoria.

Tabla 23-13. Variantes moleculares más frecuentes de G6FD, distribución geográfica y su relación con la clasificación de la OMS.

Variante	Exón	Sustitución		Clase OMS	Distribución
		Nucleótido	Amino ácido		
Lages	2	40G>A	Gly14>Arg	III	América del sur
Gaohe	2	95A>G	His32>Arg	III	China
Honiara	2	99A>G 1.360C>T	Ile33>Met Arg454>Cys	I	Islas Solomon
Orissa	3	131C>G	Ala44>Gly	III	India e Italia

Aures	3	143T>C	Ile48>Thr	III	Algeria y Tunisia
Metaponto	4	172G>A	Asp58>Asn	III	Italia
Amazonia	4	185C>A	Pro62>His	II	Brazil
G6FD A−(202)	4 5	202G>A 376A>G	Val68>Met Asn126>Asp	III	África
Namoru	4	208T>C	Tyr70>His	II	Archipiélago de Vanuatu
Ube-Konan	4	241C>T	Arg81>Cys	III	Japón e Italia
G6FD A+	5	376A>G	Asn126>Asp	III-IV	África y Mediterráneo
Vanua Lava	5	383T>C	Leu128>Pro	II	Pacífico sur-oeste
Quing Yan	5	392G>T	Gly131>Val	III	China
Mahidol	6	487G>A	Gly163>Ser	III	Sudeste asiático
Santamaría	5 6	542A>T 376A>G	Asp181>Val Asn126>Asp	II	Costa Rica e Italia
Mediterranea, Dallas, Panamá y Sassari	6	563C>T	Ser188>Phe	II	Mediterráneo
Coimbra Shunde	6	592C>T	Arg198>Cys	II	India y Portugal
Santiago	6	593G>C	Arg198>Pro	I	Chile
G6FD A−(680)	5 7	680G>T 376A>G	Arg227>Leu Asn126>Asp	III	África
Seattle, Lodi, Modena, Ferrara II y tipo-Athens	8	844G>A	Asp282>His	III	Estados unidos e Italia
Montalbano	8	854G>A	Arg285>His	III	Italia
Viangchan y Jammu	9	871G>A	Val291>Met	II	China
Kalyan, Kerala, Jamnaga y Rohini	9	949G>A	Glu317>Lys	III	India
A−(968), Betica, Selma y Guantánamo	5 9	968T>C 376A>G	Leu323>Pro Asn126>Asp	III	África y España
Chatham	9	1.003G>A	Ala335>Thr	II	Italia, Asia y África
Chinese-5	9	1.024C>T	Leu342>Phe	III	China
Ierapetra	10	1.057C>T	Pro353>Ser	II	Grecia
Iwatsuki	10	1.081G>A	Ala361>Thr	I	Japón
Serres	10	1.082C>T	Ala361>Val	I	Grecia
Aachen	10	1.089C>G	Asn363>Lys	I	Alemania
Loma Linda	10	1.089C>A	Asn363>Lys	I	Estados unidos
Calvo Mackenna	10	1.138A>G	Ile380>Val	I	Chile y Estados unidos
Tomah	10	1.153T>C	Cys385>Arg	I	Estados unidos y España
Madrid	10	1.155C>G	Cys385>Trp	I	España
B. Hills, Genova, Iwate, Niigata y Yamaguchi	10	1.160G>A	Arg387>His	I	Estados unidos , Japón e Italia
Sumare	11	1.292T>G	Val431>Gly	I	Brasil
Cassano	11	1.347G>C	Gln449>His	II	Italia y Grecia
Unión, Maewo, Chinese-2, Kalo	11	1.360C>T	Arg454>Cys	II	Italia, España, China y Japón
Cantón, Taiwán-Hakka, tipo-Gifu y tipo-Agrigento	12	1.376G>T	Arg459>Leu	II	Japón e Italia
Cosenza	12	1.376G>C	Arg459>Pro	II	Italia
Kaiping, Anant, Dhon, tipo-Sapporo y Wosera	12	1.388G>A	Arg463>His	II	China
Fukaya	13	1.462G>A	488 Gly>Ser	I	Japón
Buenos Aires	13	1.465C>T	489Pro>Ser	I	Argentina e Italia

Junto a los cambios del hemograma, los CH aumentan. La prueba consiste en exponer in vitro a GR del paciente con déficit enzimático o hemoglobinas inestables a: 1) tinciones supravitales o prueba de CH espontáneos o 2) exposición previa a un agente oxidante, seguida de tinción supravital o prueba de CH inducidos. Los CH, solo son visibles con tinciones supravitales, el color que desarrollan depende de la tinción empleada, es una estructura por lo general azul-violeta, y de hasta 4 µm de diámetro, su contorno es irregular y generalmente se localizan en el límite de la membrana, en un eritrocito débilmente teñido. La prueba de los CH, no es específica para la hemólisis por daño oxidativo, ya que en el periodo hemolítico agudo, precisamente los eritrocitos destruidos, son aquellos que presentan CH.

La confirmación diagnóstica, se realiza por cuantificación de la actividad G6FD (8-12 U/g Hb en mayores 12 meses) a través de espectrofotometría; que en la mayoría de los casos es suficiente para clasificar el déficit (figura 23-18). No obstante, la actividad de la enzima, puede estar afectada por transfusiones de GR recientes, leucocitosis o reticulocitosis marcada. En pacientes con antecedentes de ictericia, anemia neonatal, crisis hemolíticas o en el caso de mujeres heterocigotas, se recomienda la genotipificación o secuenciación completa del gen G6PD (tabla 23-13); esta prueba comprende la secuenciación completa de exones/intrones del gen G6PD (GenBank AN NM_001042351.2).

ALGORITMO DE ORIENTACIÓN DIAGNÓSTICA EN EL DÉFICIT DE GLUCOSA 6 FOSFATO DESHIDROGENASA (G6FD)
Actividad de la G6FD
Evaluar la historia clínica del paciente y sus familiares
Actividad normal
•Se puede descartar el déficit de G6FD.
•En los siguientes casos repetir la cuantificación de la actividad de la G6FD:
En recién nacidos con hiperbilirrubinemia; repetir la cuantificación a los 3 meses de edad.
En casos de hemólisis aguda la actividad de la enzima puede resultar en niveles falsamente elevados; repetir la cuantificación una vez superado el SH.
Evaluar marcadores de hemólisis y/o aumento de la eritropoyesis:
•Hemograma
•Morfología eritrocitaria
•Recuento de reticulocitos
•Bilirrubina/LDH
•TAD y/o TAI
•Otras
Actividad disminuida
•Plantear el diagnóstico de déficit de G6FD.
• Clasificar el déficit, según OMS.
Interconsulta genetista
Opcional
•Detección de variantes de G6FD.
•Análisis de genotipo o secuenciación completa del gen G6PD.

Figura 23-18. Algoritmo diagnóstico en el déficit de G6FD. El análisis de genotipo permite al mismo tiempo establecer el riesgo del uso terapéutico de ciertos medicamentos con potencial oxidativo.

Tratamiento. El manejo del paciente con déficit de G6FD, está determinado por el síndrome clínico al que está asociado y consiste en evitar en lo posible las causas que generan daño oxidativo y que puedan desencadenar SH. En caso de ictericia neonatal la fototerapia o plasmaféresis depende de la magnitud de la hiperbilirrubinemia podrá evitar el daño neurológico. En caso de SH agudo y fabismo se sugiere: soporte transfusional en casos de anemia severa y diálisis en caso de falla renal aguda.

5.3. Eritroenzimopatías del metabolismo del glutatión

Similar a la deficiencia de G6FD, el déficit de glutatión, puede presentar un curso temporal agudo, hemólisis episódica o ictericia, que puede ser desencadenada por medicamentos o habas y causar hiperbilirrubinemia neonatal. Las enzimas del metabolismo del GSH, son candidatas potenciales al déficit de glutatión (tabla 23-14 y figura 23-19)

Tabla 23-14. Eritroenzimopatías del metabolismo del glutatión

Eritroenzimopatía	Frecuencia	Herencia	Clínica
Glutatión sintetasa	10-100 casos	AR	AHCNE, 5-Oxoprolinuria †
Glutatión reductasa	<10 casos	AR	AHCNE, Favismo
γ-Glutamil cisteil sintetasa	<10 casos	AR	AHCNE †

† Hemólisis inducida por infecciones o medicamentos y enfermedad neurológica

5.3.1. Déficit de Glutatión sintetasa.

El déficit de glutatión sintetasa (GS) se ha relacionado con 1) SH crónico por déficit de GS en eritrocitos. Clínicamente se expresa como AH leve o episódica desencadenada por uso de medicamentos o consumo de habas y 2) síndrome sistémico, por déficit de GS en tejidos, se caracteriza por SH leve, acidosis metabólica grave (acidosis piroglutámica) y deterioro cerebral-cerebeloso progresivo. Aunque la actividad de la GS en pacientes homocigotos, es prácticamente indetectable, rara vez requieren tratamiento, se recomienda evitar la exposición a medicamentos y sustancias químicas con potencial oxidante y control de la acidosis piroglutámica.

5.3.2. Déficit de γ-glutamil cisteil sintetasa.

Es un déficit poco frecuente y solo los pacientes homocigotos para el déficit, presentan AH crónica, moderada-severa, desde la etapa de recién nacidos o hemólisis compensada con anemia o ictericia esporádica recurrente. Algunos casos presentan, ataxia severa, miopatía y degeneración espinocerebelosa. La actividad de la enzima, se encuentra marcadamente disminuida, pero la concentración de GSH en eritrocitos es normal o reducida.

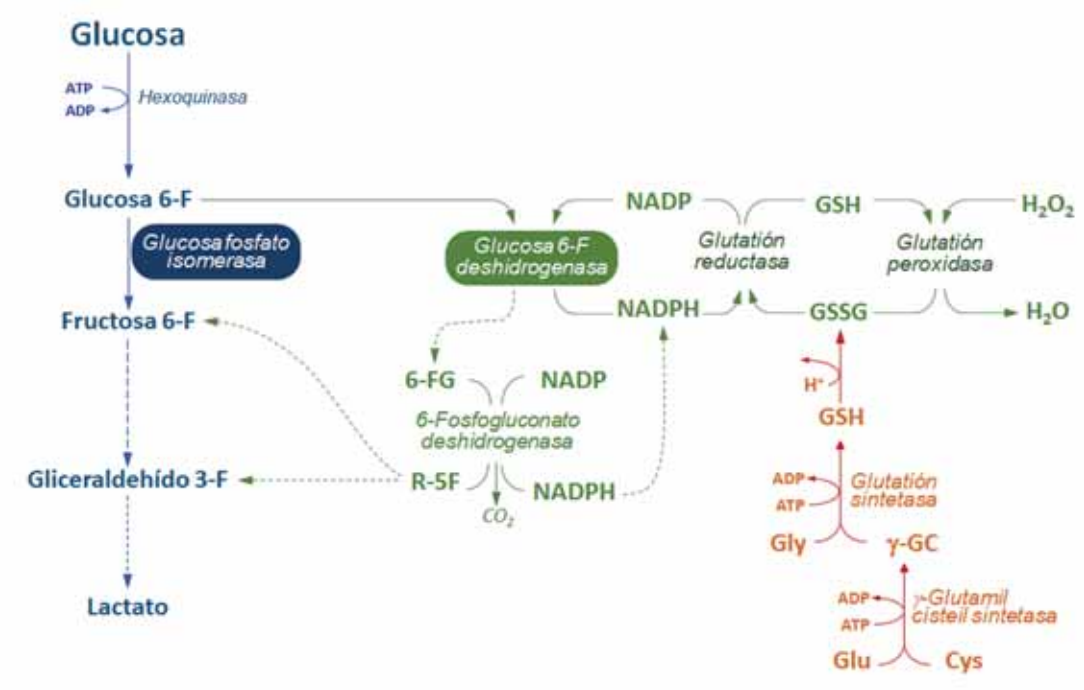


Figura 23-19. Metabolismo de las hexosas monofosfato, metabolismo del glutatión y su relación con la glicolisis. 6 fosfogluconato (6-FG), Ribulosa 5 fosfato (R-5F), Ácido glutámico (Glu), Cisteína (Cys), Glicina (Gly) y Gamma glutamil cisteína (γ-GC).

5.3.3. Déficit de Glutatión reductasa.

La enzima glutatión reductasa (GRD) es una flavoproteína, que requiere NADPH para reducir el glutatión oxidado (figura 23-19). Los pacientes con el déficit, presentan favismo, cataratas e hiperbilirrubinemia neonatal. La actividad de la enzima también puede disminuir en el déficit de B2, pero no existe evidencia de que produzca hemólisis. No se han publicado en las últimas cuatro décadas, casos de pacientes con déficit de GRD asociada a hemólisis.

5.3.4. Déficit de Glutatión peroxidasa.

La enzima glutatión peroxidasa (GP) es dependiente de selenio y cataliza la oxidación de GSH por peróxidos endógenos (H_2O_2 y peróxidos de ácidos grasos) del metabolismo celular normal (figura 23-19). Los peróxidos son reducidos a través de la GP, para ello requiere de GSH (donante de hidrógeno); el glutatión oxidado, es nuevamente reducido y regenerado por reacciones sucesivas que requieren la enzima GRD y un donante de hidrógeno (NADPH). Si bien teóricamente el déficit de GP podría generar daño oxidativo, el consenso actual es que no causa hemólisis u otros trastornos hematológicos; ya que la catalasa y la reducción no enzimática de oxidantes por GSH, son mecanismos que contribuyen a la reducción de peróxidos endógenos.

5.4. Eritroenzimopatías del metabolismo nucleotídico

Los eritrocitos maduros no realizan síntesis de purinas o pirimidinas, aun cuando poseen las enzimas para su metabolismo (figura 23-20). En el caso del metabolismo nucleotídico, este adquiere relevancia en la preservación de eritrocitos, en bancos de sangre; en ellos para evitar la hemólisis durante el almacenamiento, se agregan al anticoagulante: adenina, adenosina o inosina para mantener los niveles de ATP y 2,3 DFG. Las EZ más frecuentes asociadas al metabolismo nucleotídico son el déficit de pirimidina 5'nucleotidasa (P5N), aumento de la actividad de Adenosina desaminasa (ADA) y deficiencia de adenilato quinasa (AK) (tabla 23-15).

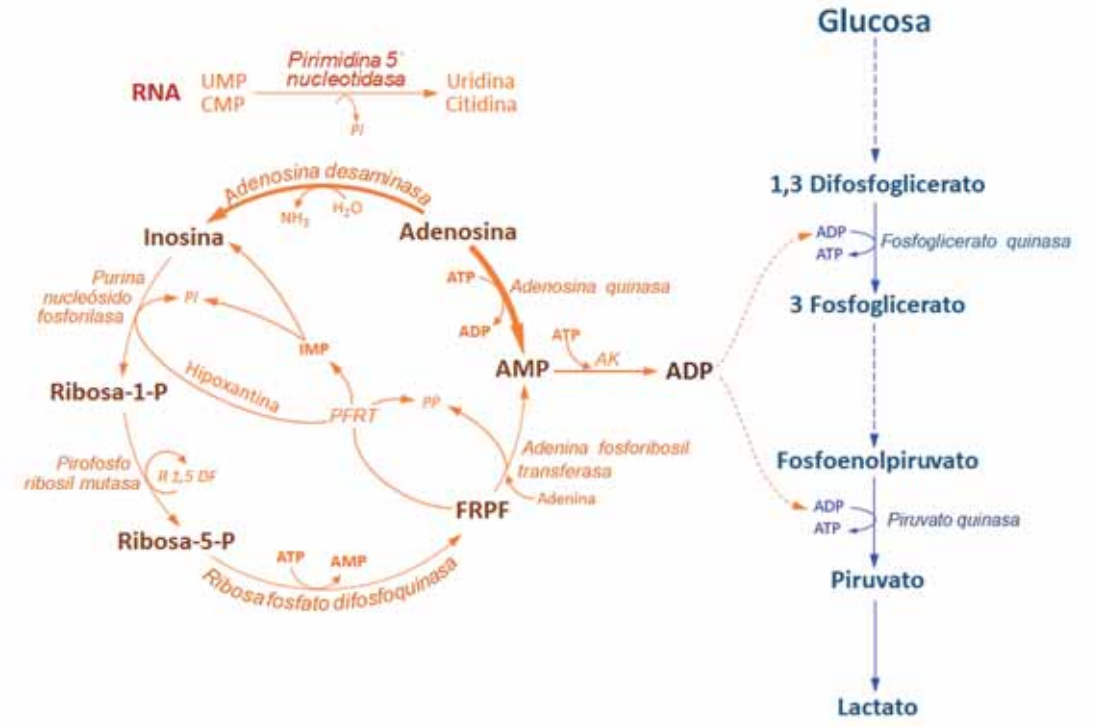


Figura 23-20. Metabolismo de nucleótidos en el eritrocito maduro. Se destaca la principal causa de AHCNE asociada al déficit de pirimidina 5'nucleotidasa. Adenilato quinasa(AK), inosina monofosfato (IMP) y Fosfo ribosil pirofosfato (FRPF).

En inmunodeficiencias y enfermedades metabólicas, con déficit enzimático en el metabolismo de las purinas; los eritrocitos expresan la deficiencia sin alterar su función o sobrevida. Son ejemplos el déficit de adenosina desaminasa (ADA) la inmunodeficiencia combinada severa y la deficiencia de purina nucleósido fosforilasa, asociada a inmunodeficiencia de linfocitos T.

Tabla 23-15. Eritroenzimopatías del metabolismo nucleotídico y su proporción en el total de las eritroenzimopatías

Eritroenzimopatía	Proporción de las EZ	Herencia	Clínica
Pirimidina 5'nucleotidasa	2–3%	AR	AHCNE moderada
Adenosina desaminasa†	<1%	AD	AHCNE leve
Adenilato quinasa	<1%	AR	AHCNE y alteraciones neurológicas

† Aumento

5.4.1. Déficit de pirimidina 5'nucleotidasa

La enzima pirimidina 5'nucleotidasa (P5N) pertenece a la vía del metabolismo nucleotídico. Su déficit hereditario provoca AHCNE crónica, con anemia leve-moderada (no afecta a leucocitos ni plaquetas), reticulocitosis, hiperbilirrubinemia y que, por lo general, no requiere soporte transfusional. El déficit de P5N compite en frecuencia con el déficit de GFI, que en algunas zonas geográficas como Japón, se presenta como la tercera en frecuencia, después de la deficiencia de PK. El déficit de P5N, bloquea la degradación del RNA (propio de la maduración del GR normal) y su exceso en GR maduros, explica el abundante punteado basófilo grueso y la disminución intracelular de citidina y uridina. La esplenectomía produce un leve aumento de la Hb, pero sin una mejoría clínica significativa.

El déficit adquirido de la P5N se produce en la intoxicación por plomo (saturnismo), así cuando los niveles de plomo son > 200 µg/dL (VR <5 µg/dL en adultos), la actividad de P5N disminuye a niveles comparables al estado homocigoto del déficit y con acumulación de nucleótidos de pirimidina e inhibición del *shunt* de las pentosas fosfatos. El diagnóstico confirmatorio del déficit hereditario requiere demostrar 1) descenso de la actividad nucleotidasa en GR, 2) aumento de nucleótidos de pirimidina en GR y 3) detección de mutaciones en el gen *NT5C3A* por NGS.

5.4.2. Déficit y aumento de adenosina desaminasa.

La adenosina es sustrato común para dos enzimas, la adenosina quinasa (ADK) y la adenosina desaminasa (ADA). Por diferencias de *Km*, el metabolismo ocurre principalmente a través de la ADK que fosforila la adenosina y forma AMP (figura 23-20).

El diagnóstico del déficit hereditario de la ADA, asociado a inmunodeficiencia combinada severa se realiza por análisis de la actividad enzimática y el aumento de la adenina en eritrocitos; sin embargo, estos cambios bioquímicos, no afectan la fisiología y sobrevida del eritrocito.

Sorprendentemente, la hemólisis (AHCNE) leve-moderada, con reticulocitosis e hiperbilirrubinemia, se presenta cuando la actividad de la enzima aumenta 60-100 veces lo normal, por agotamiento de los niveles de ATP en el eritrocito (figura 23-20). No se han identificado mutaciones que expliquen el aumento de la actividad de la enzima en eritrocitos (no en otros tejidos), la que es única entre las EZ, ya que está asociada a un aumento y no a un déficit de la enzima. El diagnóstico se sospecha frente a la disminución de la concentración de ATP en eritrocitos y se confirman al demostrar una mayor actividad de ADA en hemolizados. Por lo general, no está indicado un tratamiento específico, ya que la mayoría de los pacientes presentan solo AHCNE leve.

5.4.3. Déficit de Adenilato quinasa.

La adenilato quinasa (AK) cataliza la interconversión de nucleótidos de adenina con síntesis de ADP a partir de AMP; de esta manera la AK, tiene un rol fundamental en la regulación del AMP y del *pool* de nucleótidos de adenina en los eritrocitos (figura 23-20).

La expresión clínica del déficit de AK es variable e incluye AHCNE moderada-severa cuando se coexpresa junto con otros déficits de fosfotransferasas y en algunos casos retraso metal. La esplenectomía puede mejorar los síntomas.

6. HEMOGLOBINOPATÍAS

Las hemoglobinopatías (HbP) son alteraciones hereditarias, cualitativas o cuantitativas de las globinas (globinopatías); son secundarias a mutaciones, que resultan en una modificación estructural (HbP estructurales) o la disminución o ausencia de la síntesis de una o más cadenas de globinas, en ausencia de alteraciones estructurales (talasemias). Ambos trastornos afectan aproximadamente a 300 millones de pacientes y constituyen a nivel mundial el trastorno genético más frecuente. Las HbP causan graves problemas de salud pública en muchos países en desarrollo y en otras comunidades desarrolladas con gran número de inmigrantes procedentes de áreas de alta incidencia. Las características clínicas, son muy variables, desde pacientes asintomáticos, hasta casos que pueden provocar la muerte.

A pesar de los innegables avances en el conocimiento de la estructura, función de las Hb, aún no se cuenta con un tratamiento curativo para estas enfermedades, y las medidas terapéuticas en pacientes con talasemias-β generan gran impacto social y económico. Por ello la consejería genética, la planificación familiar y el diagnóstico prenatal son la base fundamental del manejo y tratamiento del paciente. A nivel de laboratorio, los pacientes portadores de síndromes talasémicos, presentan microcitosis, por lo que el análisis del VCM junto a otros parámetros, permite fácilmente su detección. Por el contrario, en la mayoría de los pacientes con hemoglobinopatías estructurales, el diagnóstico requiere de métodos más avanzados para detectarlos, como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), electroforesis capilar o espectroscopía de masas. Estos

métodos están dirigidos al diagnóstico de HbS, HbC, HbE o sus combinaciones. Países desarrollados, en los cuales estas alteraciones son más frecuentes por el impacto migratorio, están situados a la cabeza de este tipo de estudios.

Por otra parte, está perfectamente establecida la relación entre algunos tipos de Hb anormales con determinados grupos raciales (especialmente en zonas endémicas de malaria), que aportan a la investigación de los tipos de Hb, una variable etnológica. Estas investigaciones aportan correlaciones en torno a la influencia de movimientos poblacionales o migraciones, en la composición étnica del área geográfica que se estudia y su repercusión o no, en la salud pública en la nueva población que se forma.

6.1. Talasemias

Las talasemias son alteraciones hereditarias, que se las puede clasificar según 1) las manifestaciones clínicas: menor, intermedia o mayor; 2) la magnitud del déficit de las cadenas de globinas: ausencia total (α° o β°) o disminución de síntesis (α+ o β+) o 3) según el tipo de cadena afectada, que a su vez se clasifican en:

- Talasemias-α, disminución de la expresión en las cadenas de α globinas
- Talasemias-β, disminución de la expresión en las cadenas de β globinas
- Talasemias-δβ, disminución simultánea en la expresión de las cadenas de globinas δ y β
- Talasemias que expresan cadenas de globinas híbridas δ y β (Hb Lepore) y
- Talasemias que coexpresan HbP estructurales (HbE). Es en este caso y otros que, una diferenciación rígida entre cambios estructurales y cuantitativos para clasificar las HbP ya no es apropiada.

La síntesis de cadenas de Hb, en eritroblastos de pacientes con talasemias-β, las cadenas α en exceso son incapaces de formar homotetrámeros estables y precipitan en el citoplasma precursores eritroides como hemicromos-α. Estas inclusiones impiden la maduración de los eritroblastos y favorecen la eritropoyesis ineficaz, que contribuye al mecanismo fisiopatológico principal de la anemia (figura 23-21). Si los hemicromos se expresan en los eritrocitos, provoca su destrucción o hemólisis extravascular. La síntesis parcial de cadenas β (talasemia-β+) genera la disminución de cadenas β y da lugar a un aumento compensatorio de cadenas δ, que aumenta la concentración de Hb A2 (portador talasémico) y, en ausencia total de síntesis (talasemia-β°), junto con el aumento de Hb A2 se observa anemia microcítica hipocrómica con aumento de la Hb fetal (Hb F).

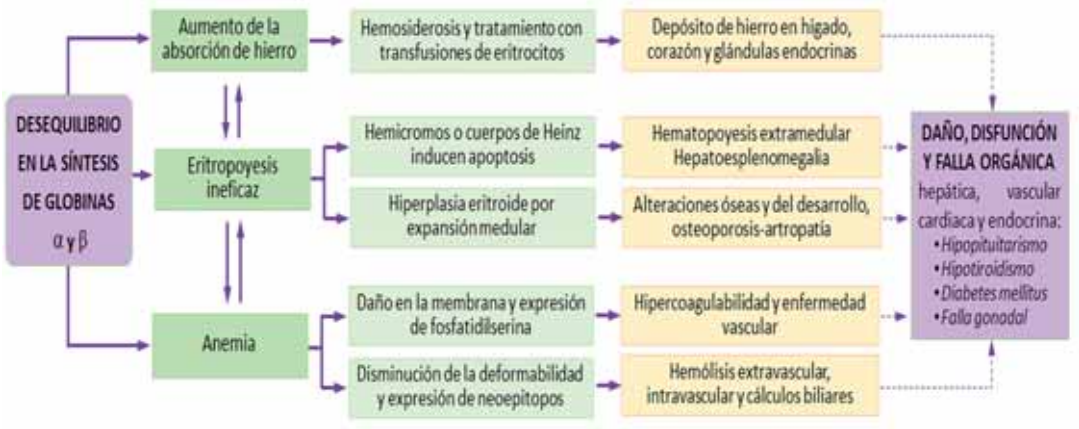

DESEQUILIBRIO EN LA SÍNTESIS DE GLOBINAS α y β
Aumento de la absorción de hierro
Eritropoyesis ineficaz
Anemia
Hemosiderosis y tratamiento con transfusiones de eritrocitos
Depósito de hierro en hígado, corazón y glándulas endocrinas
Hemicromos o cuerpos de Heinz inducen apoptosis
Hiperplasia eritroide por expansión medular
Hematopoyesis extramedular Hepatoesplenomegalia
Alteraciones óseas y del desarrollo, osteoporosis-artropatía
Daño en la membrana y expresión de fosfatidilserina
Disminución de la deformabilidad y expresión de neoepitopos
Hipercoagulabilidad y enfermedad vascular
Hemólisis extravascular, intravascular y cálculos biliares
DAÑO, DISFUNCIÓN Y FALLA ORGÁNICA
hepática, vascular cardiaca y endocrina:
•Hipopituitarismo
•Hipotiroidismo
•Diabetes mellitus
•Falla gonadal

Figura 23-21. Fisiopatología de los síndromes talasémicos.

En las talasemias-α, el exceso de cadenas γ y β sin aparear, se agrupan en homotetrámeros de Hb, conocidos como Hb Bart (γ_4) y Hb H (β_4) respectivamente. Si bien ambos tipos de hemoglobinas son inestables y precipitan, solo lo hacen en eritrocitos que presentan mayor tiempo en circulación. Por esta razón los pacientes con talasemias-α presentan SH leve-moderado y menor grado de eritropoyesis ineficaz comparado con los que padecen talasemia-β. A nivel fisiológico, la Hb Bart y Hb H poseen alta afinidad por el oxígeno que al no presentar el efecto hemo-hemo, las inhabilita y dificulta la entrega de oxígeno a los tejidos.

6.1.1. Talasemias-α

Existen dos formas clínicas de talasemias α: el *Hydrops fetalis* por Hb Bart y la enfermedad de la Hb H, las cuales resultan de la interacción de dos determinantes genéticos talasémicos α (α^0 y α^+).

a) Talasemia-α^0. Resulta de la pérdida o deleción de ambos genes de globinas α, del cromosoma 16 cuyo haplotipo es (- -/- -), o bien por deleción de la región reguladora HS-40.

b) Talasemia-α^+. Se presenta en la deleción de uno de los genes α, de cada alelo, o en casos denominados "no deleción" donde los genes α están intactos, pero contiene mutaciones que lo hacen inactivo parcial o totalmente. Se clasifican en:

- **Tipo deleción.** Su haplotipo es (- α/) y (- α / - α)
- **Tipo no deleción.** En estos casos, los genes α están intactos. El defecto se presenta por mutaciones puntuales, deleciones o sustituciones, en genes que regulan la expresión/síntesis de α globinas ($\alpha\alpha^T$), que la hace más severa que el haplotipo - α/. Las alteraciones se producen a nivel de la transcripción, procesamiento y traducción del RNA.
- **Hemoglobina Constant Spring.** Se considera una HbP estructural-talasémica. El defecto produce simultáneamente la disminución de la síntesis de una cadena de globina, con alteración de su estructura primaria. Se origina por la mutación de una base (142 TAA→CAA, Stop Gln), que cambia el codón de término de la cadena α, por glutamina. Esto hace que la traducción del mRNA,

continúe al siguiente codón de término, ubicado dentro de la secuencia de poliadenilación. El resultado es la disminución severa de la síntesis de globinas α (~1%), con 31 aminoácidos más, en el extremo C-terminal. El haplotipo es (α^{CS} /).

Las cadenas α, son necesarias para la producción de Hb F, en la eritropoyesis fetal, por esta razón, los casos más severos de talasemias-α, pueden ser sintomáticos durante la etapa intrauterina. Las alteraciones en uno o más de los cuatro genes α (dos de cada progenitor) y la capacidad de síntesis de cadenas determinan las combinaciones genotípicas que establecen fenotipos clínicos específicos.

- **Portador silente o Talasemia-α+.** Se presenta frente a la deleción de un gen de las cadenas α. Son pacientes sanos, sin manifestaciones clínicas ni hematológicas. La HPLC de Hb es normal y solo puede detectarse mediante estudios genómicos o electroforesis capilar. Su genotipo puede ser (-α/αα), ($\alpha\alpha^{T}$/αα), ($\alpha\alpha^{CS}$/αα). La importancia de su diagnóstico radica en el consejo genético.
- **Rasgo talasémico.** Se produce por la deleción de dos genes de cadenas α (-α/-α), en cada alelo (talasemia-α+ homocigotas) o talasemia-α° heterocigotas (- -/αα). Las deleciones más comunes en el área mediterránea corresponden a la deleción -$\alpha^{3.7}$ de 3.7 kb y la -$\alpha^{4.2}$ de 4.2 kb. La anemia es leve, asintomática y microcítica hipocrómica. La HPLC de Hb es habitualmente normal con Hb F normal, Hb A2 normal o levemente disminuida (<2%). El paciente no requiere tratamiento.
- **Hemoglobinopatía H o talasemia intermedia.** Consiste en la pérdida de tres genes α (- -/-α). El exceso de cadenas β precipitan como cuerpos de Heinz y forman una Hb anormal característica, la Hb H (β4), que se puede visualizar con azul cresil brillante. Esta HbP, se caracteriza por su gran variabilidad molecular y clínica, hepatoesplenomegalia, alteraciones óseas, colelitiasis y úlceras en extremidades. El paciente puede evolucionar con anemia hemolítica leve-moderada o crisis hemolíticas (por medicamentos o infecciones), que requieren soporte transfusional. La HPLC de Hb, muestra Hb H elevada (5-40%), concentración variable de Hb Bart, Hb A2 disminuida (<2%) y Hb F normal. Las formas graves pueden presentar manifestaciones clínicas similares a la talasemia mayor.
- ***Hydrops fetalis* o Hb Bart.** Es la forma más severa de talasemia-α (talasemia mayor) que es incompatible con la vida. Se relaciona con la deleción de los cuatro genes de cadenas α (- -/- -), que favorece la formación de Hb Bart. En la mayoría de los casos, el cuadro clínico es *Hydrops fetalis*, con edema marcado, ascitis, hepatoesplenomegalia y hematopoyesis extramedular, que se confirma en la necropsia por muerte fetal intrauterina (23-28 semanas) o poco después del nacimiento. La anemia al momento del nacimiento es severa, microcítica hipocrómica con poiquilocitosis marcada; también se observa aumento de reticulocitos y eritroblastosis marcada. La HPLC de Hb, muestra aumento de Hb Bart (~80%), Hb H (~20%) y Hb Portland; Hb F y Hb A ausentes.

6.1.2. Talasemias-β

Las talasemias-β resultan de la síntesis reducida (β^{+}) o ausente (β^{o}) de cadenas de globinas β; estas se encuentran codificadas por el gen HBB (gen β) ubicado en un clúster de 45 kb. junto a los genes de globinas δ y γ en el brazo corto del cromosoma 11 (11p15.5). Se han descrito más de 200 mutaciones en el gen β, asociadas a β-talasemias. La mayoría corresponde a mutaciones puntuales que producen alteraciones en la transcripción, traducción o maduración de mRNA de estas cadenas. Las talasemias-β se clasifican en 4 grupos según sus manifestaciones clínicas y la gravedad del déficit que dan origen a cuadros clínicos de gravedad variable:

- **Talasemia menor (rasgo talasémico o β-talasemia heterocigota).** Es el resultado del estado heterocigoto para una mutación del gen β y es la forma más frecuente de talasemia-β en España y países de la ribera mediterránea. Los pacientes, portan un gen β normal y el otro alterado, por mutaciones que otorgan el fenotipo talasémico (β°/β o β+/β). Característicamente, Hb A2, Hb F o ambas se encuentran elevadas; el aumento de la Hb A2, es consecuencia de la expresión del gen δ adyacente al 1) gen β mutante o 2) al alelo del gen β normal. Sus características hematológicas son variables, desde una pseudopolicitemia microcítica, hasta anemia microcítica hipocrómica leve, (asintomática); el mielograma muestra hiperplasia eritroide leve y signos de eritropoyesis ineficaz que fisiopatológicamente se atribuye a la expresión hemicromos-α. Los pacientes con talasemia menor, no requieren tratamiento, pero si consejería genética que pueda evaluar la posibilidad de talasemia mayor o intermedia en la descendencia de padres con talasemia menor; naturalmente la expresión clínica dependerá de la mutación en los padres heterocigotos.
- **Talasemia intermedia.** Su expresión clínica es variable (entre la talasemia menor y mayor) y describe a pacientes con anemia y esplenomegalia pero, que no cubre todo el espectro de gravedad de la talasemia mayor. La anemia hemolítica es leve-severa, microcítica hipocrómica con reticulocitosis y está asociada al aumento de hemicromos-α, como causa de anemia por eritropoyesis ineficaz. Los pacientes con talasemias intermedias leves son prácticamente asintomáticos hasta la adultez (solo presentan anemia leve). En pacientes con talasemia intermedia grave los síntomas comienzan entre los 2-6 años, por lo que el crecimiento y el desarrollo pueden retrasarse; estas y otras secuelas dependen de tres factores 1) eritropoyesis ineficaz, 2) la gravedad de la anemia y 3) la sobrecarga de hierro (figura 23-21). La mayoría de los pacientes con talasemia intermedia son homocigotos o heterocigotos compuestos, para mutaciones que afectan al gen de la β globina (β+/β+, β°/β+, $\beta^{\circ}/\beta^{variante}$). La HPLC de Hb muestra un leve aumento de la Hb A2 (5-8%) y de la Hb F > 2%.
- **Talasemia mayor o anemia de Cooley.** Es la forma más grave; los síntomas comienzan a los 5-6 meses de vida. Durante los 2 primeros años, los pacientes presentan palidez, ictericia e infecciones. La anemia es severa, microcítica hipocrómica (hemolítica) con reticulocitosis leve y eritroblastosis, que requiere de soporte transfusional. Progresivamente aparecen otras complicaciones como hepatoesplenomegalia, alteraciones endocrinas y colelitiasis. Presentan también alteraciones esqueléticas y retraso del crecimiento por hiperplasia

eritroide compensatoria, que causa la expansión medular en huesos planos y largos. Son típicas las alteraciones radiológicas como el "cráneo en cepillo" en casos avanzados o pacientes que no han recibido tratamiento. En pacientes que inician un programa de transfusiones periódicas y precoces, el riesgo de complicaciones está determinado por la sobrecarga de hierro y el daño orgánico asociado (figura 23-21). Los pacientes con talasemia mayor son homocigotos (β+/β+, β+/β°, β°/β°) y dependiendo de la mutación, la expresión de globinas β, es muy escasa o ausente. El estudio de Hb muestra aumento de la Hb F (60-98%), Hb A2 normal o levemente disminuida y Hb A variable.

Las características hematológicas más frecuentes en las talasemias, junto a la historia clínica del paciente y su origen étnico, es el hallazgo en el hemograma de anemia microcítica o microcítica hipocrómica, frente al cual se deberá realizar un diagnóstico diferencial amplio, que incluya: la anemia ferropénica, anemia por inflamación y anemias sideroblásticas. En este contexto puede resultar útil la aplicación de índices para diferenciar entre talasemias y anemia ferropénica; uno de varios es el índice de Mentzer (Índice de Mentzer = VCM/R. eritrocitos), el cual si es <13, apoyará el diagnóstico de talasemia.

6.1.3. Talasemia δ β.

Se debe a un defecto en la síntesis de cadenas δ y β. Su forma heterocigota, se caracteriza por, un cuadro talasémico menor con Hb A2 normal y niveles relativamente altos de Hb F (5-15%); así como ausencia de Hb A, A2 y 100% de Hb F, en el estado homocigoto y expresión clínica similar a talasemia intermedia. Se clasifican según la estructura de la Hb fetal en Gγ $(\delta\beta)^0$ y GγAγ $(\delta\beta)^0$.

6.1.4. Talasemia γ δ β.

Se han observado solo en portadores heterocigotos. Su característica hematológica es similar a la talasemia β, con hemólisis neonatal y niveles de Hb A2 normal en adultos.

6.1.5. Síndromes hemoglobina Lepore.

Se producen a partir de un gen nuevo, fusionado durante el entrecruzamiento en la meiosis de los genes δ y β y transmitido posteriormente de forma mendeliana simple (figura 23-22).

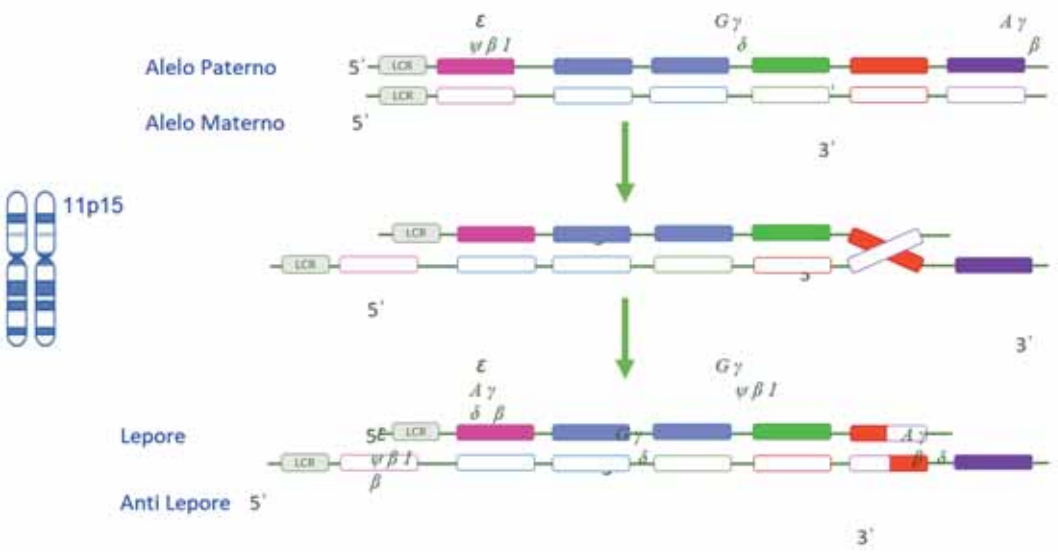


Figura 23-22. Formación del cromosoma Lepore

Existe una síntesis ineficaz de una cadena no α híbrida, estructuralmente anormal, formada por una porción N-terminal idéntica a la cadena δ y por una C-terminal idéntica a la β. El punto de fusión es variable en los tres tipos detectados: Boston, Baltimore y Hollandia, todas ellas con propiedades similares.

La síntesis de la cadena δβ de la Hemoglobina Lepore (Hb L), en el periodo neonatal, sigue un patrón idéntico al de las cadenas δ y por lo tanto de la Hb A2. En adultos, la Hb L se identifica fácilmente por electroforesis capilar, ya que el análisis por HPLC, muestra el mismo tiempo de retención que la Hb A2 (elevada en pacientes heterocigotos). Las características hematológicas son similares a las de pacientes con talasemias-β heterocigota. En cuanto a las manifestaciones clínicas, el estado homocigoto de la Hb L, varían entre la talasemia intermedia y mayor; esto significa ausencia de Hb A y A2 con aumento de Hb F y Hb L (~15%). La forma heterocigota es asintomática y presentan solo microcitosis con discreto aumento de Hb F.

6.2. Persistencia hereditaria de hemoglobina fetal (PHHF)

La PHHF es una condición poco frecuente que se presenta en afroamericanos con un aumento de la síntesis de Hb F en ausencia de alteraciones hematológicas. Sin embargo, si el hijo hereda el gen de la PHHF de uno de los padres y el gen de las células falciformes del otro, provoca una condición Hb S/PHHF, que aparenta ser una anemia de células falciformes en los análisis de laboratorio realizados al momento del nacimiento. Existen diferencias fenotípicas, ya sea en la proporción de Hb F producida, como en la relación de las cadenas Gγ/Aγ que contienen. El análisis molecular muestra que el *cluster*, de la β globina está intacto (PHHF-no deleción); mientras que en otros, existen deleciones en el extremo 3'del *cluster* y remoción completa de los genes δ y β (PHHF deleción).

- **Tipo deleción.** Representan la mayoría de los casos y se debe a deleciones, que incluyen los genes δ y β. Es muy similar a la talasemia-δβ, excepto que en heterocigotos es mayor la Hb F y en homocigotos el cuadro hematológico y síntesis de globinas es similar a la talasemia-β heterocigota, con aproximadamente un 10% de Hb F.
- **Tipo no deleción.** El trastorno se origina por mutaciones en una base dentro o fuera del grupo de genes γ-δ-β. En estos casos, la producción de cadena γ deriva casi completamente de uno de los dos genes γ.

6.3. Hemoglobinopatías talasémicas o Interacción del fenotipo talasémico con hemoglobinopatías estructurales.

Cuando un paciente hereda un gen talasémico, de una determinada cadena de globina que afecta a uno de los alelos y un gen, para una variante estructural del mismo tipo de cadena de globina en el otro alelo, el porcentaje observado de la Hb estructuralmente anormal aumenta por sobre el nivel encontrado en un heterocigoto simple para esa variante estructural y la severidad clínica se expresa de manera similar a una homocigocidad para la Hb anormal. Por otro lado, cuando un paciente hereda la combinación: talasemia de un tipo de cadena de globina (p. ej., β) y un gen para una variante estructural del otro tipo de cadena (α) no se observa aumento en la proporción de la Hb anormal, y las manifestaciones clínicas son similares a las del estado heterocigoto de la variante estructural.

Talasemias-β en asociación con variantes estructurales de cadena β

• **Hemoglobina S/talasemia-β.** Afecta a pacientes con ascendencia mediterránea y africana. El cuadro clínico simula a la anemia de células falciformes, pero con un curso moderado o excepcionalmente leve. Estas diferencias se deben a la interacción del gen β^S, con los diferentes tipos de talasemias-β (β^0 o forma grave y β^+ o forma leve) que, como se sabe, reduce la producción de cadenas beta normales (β^A). La esplenomegalia es una característica común y de ayuda, para diferenciarla de la anemia por células falciformes en adultos y adolescentes. Los hallazgos de laboratorio incluyen anemia de severidad variable, microcítica hipocrómica con codocitos y ocasionalmente drepanocitos en los casos más graves. El estudio de cuantificación de Hb, por HPLC muestra: 0-30% de Hb A, aumento de Hb A2, 60-90% de Hb S y 1-15% de Hb F.

• **Hemoglobina S/Hemoglobina Lepore.** Los casos descritos muestran un amplio espectro de severidad clínica, anemia hemolítica y hepatoesplenomegalia. La cuantificación de Hb, muestra ausencia de Hb A, 1-3% de Hb A2, 60-90% de Hb S, 10% de Hb L y 9-25% de Hb F.

• **Hemoglobina S/Talasemia-δβ.** Se presenta asociada a un cuadro clínico leve, probablemente por el aumento de Hb F, que protege al paciente de la falciformación y de las crisis vaso-oclusivas si se compara con los homocigotos y heterocigotos de Hb S. El perfil de Hb muestra ausencia de Hb A, 15-25% de Hb F, 60-70% de Hb S y Hb A2 normal.

• **Hemoglobina C/talasemia-β:** Esta condición se presenta en pacientes de raza negra, con anemia microcítica hipocrómica moderada y abundantes codocitos; la HPLC muestra 15-30% de Hb A (en caso de Hb C/β^+ talasemia), 2-5% de Hb F y 65-80% de Hb C. La Hb C/talasemia-β^0 es menos frecuente y se presenta con anemia severa y esplenomegalia; la Hb A está ausente, similar a los homocigotos con Hb C.

• **Hemoglobina C/Hemoglobina Lepore.** Produce un trastorno leve similar, a la Hb C/β^+.

• **Hemoglobina C/talasemia-δβ**. Ocasiona un cuadro similar a la Hb C/β+ talasemia; los niveles relativamente elevados de Hb F en GR, reducen la severidad del SH secundario a la presencia de Hb C.

• **Hemoglobina E/talasemia-β.** Es común en Tailandia y en el Sudeste de Asia; por razones aún no conocidas, es tan severa como la talasemia-β homocigota. La Hb E, por sí misma, se asocia con un fenotipo de talasemia-β (disminución en la síntesis de cadenas β^E), a causa de alteraciones en el procesamiento del mRNA de la globina β^E. Sin embargo, el déficit total de la síntesis de globina, en la Hb E homocigota, es equivalente a la talasemia-β heterocigota (alteración benigna). Por ello es difícil entender, una enfermedad severa, en los dobles heterocigotos para Hb E y talasemia-β; se ha sugerido que el fenotipo, es inestable al estrés oxidativo endógeno y el exceso de cadenas α generado por el estado doble heterocigoto, produciría hemicromos-α y por lo tanto mayor hemólisis.

El perfil de hemoglobina muestra ausencia de Hb A, aumento de Hb E y ~50% de Hb F, ya que la mayoría de los casos se asocian con talasemia-β^0. Otras asociaciones con la talasemia-β, pero menos frecuentes son Hb D, Hb J-Baltimore, Hb Hofu, y Hb G.

Talasemia-β en asociación variantes estructurales de cadena α.
Los casos descritos proporcionan información sobre la regulación post-transcripcional de la síntesis de Hb. Cuando el portador de una variante estructural de cadena α, posee también un gen de talasemia-β, la proporción de la cadena α-variante es por lo general más baja que el estado heterocigoto simple. Esto se explica por un desequilibrio, en la síntesis de cadenas de globina α y, aunque las cadenas α-normales y α-variantes se sintetizan a la misma velocidad, la degradación de las cadenas α-variantes es mayor. Además, si el desequilibrio es severo, la proporción limitada de cadenas β y γ, la tetramerización de las hemoglobinas tendrá uso preferente de cadenas α-normales, respecto de las α-variantes.

Talasemia-α en asociación con variantes estructurales de cadena β que incluye Hb S, Hb C, Hb E y Hb J-Bangkok.
• **Hemoglobina S/talasemia-α.** Es un fenotipo de interés clínico por los efectos de la globina α^T, sobre la expresión de Hb S, que se acumula en los GR. Es conocido que los pacientes que heredan un fenotipo talasemia-α y un estado

heterocigoto para Hb S (Hb AS) poseen niveles de Hb S menores que los normalmente encontrados en heterocigotos para Hb S; esta disminución, se ha relacionado con un recambio menos eficiente de las cadenas β^S en comparación con las β^A, en el pool limitado de cadenas α disponibles.

Estudios moleculares también han confirmado la relación entre el genotipo de la talasemia y los niveles relativos de Hb S en pacientes que además portan el defecto heterocigotos de Hb AS. Los pacientes con genotipo 1) (αα/αα) presentan más de un 35% de Hb S, 2) con genotipo (- α/αα) 28-35% de Hb S, 3) con genotipo (- α/- α) menos de 25-30% de Hb S y 4) con genotipo (- - /- α) hasta un 20% de Hb S.

La talasemia-α atenúa algunas de las consecuencias clínicas hematológicas de la Hb S. Los pacientes con genotipo (- α/- α) presentan niveles de Hb más alta, con VCM y HCM más bajos, que la anemia por células falciformes (Hb AS o Hb SS); así como la reticulocitosis y bilirrubinemia sérica son más bajos que en los pacientes sin talasemia-α concomitante. La mejoría en los indicadores de hemólisis y clínicos (enfermedad vasooclusiva) por efecto de la talasemia-α, se relaciona con la disminución relativa de la Hb S eritrocitaria.

- **Hemoglobina C/Talasemia-α.** Los pacientes presentan niveles de Hb C más bajos (~30%), que los normalmente encontrados en pacientes homocigotos o heterocigotos para la Hb C (~42%).

Talasemia α en asociación con variantes estructurales de cadena α.
Son alteraciones muy poco frecuentes, debido a que el fenotipo se hereda desde dos condiciones que por sí mismas se expresan con baja frecuencia. Se han descrito interacciones con Hb I, Hb Q, Hb G-Philadelphia, Hb J-México, Hb J-Tangariki, Hb J-Cape Town y Hb Hasharon. La expresión relativa de estas variantes estructurales heterocigotas de es ~25% o menos del total de las Hb, pero al expresarse conjuntamente a la talasemia-α, esta proporción aumenta directamente en relación al número de genes α delecionados. El cuadro clínico de estos dobles heterocigotos es el que corresponde al tipo de talasemia.

6.4. Hemoglobinopatías estructurales

Con este nombre se denominan las Hb patológicas, que presentan biosíntesis normal y mutaciones en las cadenas de globina que generan pequeños cambios en uno o más aminoácidos. Estos cambios estructurales, generan cambios funcionales amplios en las propiedades de las hemoglobinas.

6.4.1. Nomenclatura.

Existen tres sistemas distintos de nomenclatura para las variantes de Hb: (a) nombre común, asignado por el investigador que primero descubre la nueva Hb, (b) designación según el sitio y aminoácido (s) sustituido en la cadena de globina y (c) designación de acuerdo con la posición sustituida en la hélice. En

un inicio se utilizaron las letras del alfabeto de forma secuencial, reservándose la letra A para designar la Hb del adulto, F para la Hb fetal y la S para la Hb que causa la anemia drepanocítica. La única excepción es la letra B que no se adjudicó a ninguna variante para evitar posibles confusiones con el grupo sanguíneo ABO. Este sistema funcionó hasta 1956 debido al número limitado de letras y, porque algunas variantes con movilidad electroforética similar presentaban propiedades funcionales y estructurales diferentes. Posteriormente se acordó nombrar cada Hb, según el origen geográfico.

La nomenclatura molecular, es la que aporta mayor información e indica en la cadena afectada la posición del aminoácido sustituido. De este modo la Hb S se designa como $\alpha_2\beta_2{}^{6Glu\rightarrow Val}$, o bien $\alpha_2\beta_2{}^{6Val}$; de esta manera se indica la naturaleza de la sustitución del aminoácido, ácido glutámico por valina, en la sexta posición (desde el extremo N al C-terminal) de la globina-β. En el momento actual y utilizando el mismo ejemplo de la Hb S, se recomienda: indicar solo la cadena afectada (β), la posición (6) junto al segmento de la hélice que se encuentra el aminoácido afectado (A3) y finalmente el aminoácido normal y el sustituido (Glu→Val). Por lo tanto, bajo esta nomenclatura la Hb S se designa: β6 (A3) Glu→Val.

La ventaja al indicar el segmento de la hélice afectada, es aportar información inmediata de la función y homología con otras variantes, que afecten a regiones similares en otros tipos de globinas o hemoglobinas. En el caso la Hb-Chesapeake α92 (FG4) Arg→Leu y Wood β97 (FG4) His→Leu, ambas, pero en cadenas diferentes, presentan el mismo segmento afectado; el que está relacionado con la afinidad por el oxígeno; no sorprende entonces que la expresión clínica de ambas variantes sea similar.

6.4.2. Base genética de las hemoglobinopatías estructurales

Las variantes de hemoglobinas, de acuerdo a la genética mendeliana clásica, son heredadas como rasgos codominantes. Si ambos padres son heterocigotos para la Hb S, existe un 50% de probabilidad que el hijo sea heterocigoto como sus padres (Hb AS), 25% que sea normal y 25% que sea homocigoto Hb SS.

Si uno de los padres es heterocigoto para la Hb S (AS) y el otro heterocigoto para la Hb C (AC), existe un 25% de posibilidades, que el hijo sea doble heterocigoto (Hb SC). La expresión del gen para la Hb S es relevante clínicamente (morbilidad) solo si es heredado de forma homocigota (SS), o doble heterocigota (SC, SD-Los Angeles, SO-Arab o S/talasemia-β). En contraste, las variantes inestables y aquellas con alteraciones severas en la afinidad por el oxígeno, causan morbilidad en pacientes heterocigotos, y en homocigotos con deterioro severo de la función de la Hb son incompatibles con la vida.

Debido a que un individuo hereda solo 2 genes de cadena β, una variante de cadena β con función anormal, representa la mitad de la Hb total y por lo tanto contribuirá de manera significativa al deterioro en la función del GR. En contras-

te, las variantes de cadena α, generalmente constituyen solo el 25% de la Hb total y es menos probable que causen deterioro significativo de la función del GR. Esta observación explica porqué el 50% de las variantes de cadena β expresan manifestaciones clínicas, comparadas con solo el 20%, de las variantes de cadena α. Solo en forma muy ocasional las variantes de hemoglobinas se originan como mutaciones espontáneas, que afectan a las stem cell durante el desarrollo tardío.

Variantes estructurales de Hb también se han encontrado en los genes de globina δ y γ. La menor proporción de variantes detectadas en estas cadenas, tiene relación con el rol fisiológico y la proporción que representan las Hb que forman en >6 meses de vida. En términos generales, los defectos funcionales descritos en las cadenas γ son: Hb F-Cincinnati (41Gγ Phe→Ser) que cursa con cianosis, Hb F-Onoda (146Gγ His→Tyr) que presenta aumento de la afinidad por el oxígeno, Hb F-Poole (130Gγ Trp →Gly) variante de Hb inestable, que cursa con AH al igual que la Hb F-Xinjiang (25 AγT Gly→Arg), Hb F-M-Fort Ripley (92Gγ His→Tyr) y la Hb F-M Osaka (63Gγ His→Tyr) que cursan con Hemoglobina M y cianosis neonatal.

6.4.3. Clasificación de las hemoglobinopatías

a) Clasificación según el trastorno genético

- **Sustitución de una base.** El 95% de las HbP presentan mutaciones que producen el cambio de un aminoácido en alguna de las cadenas de globinas. Con menos frecuencia, se observan cambios de aminoácidos en dos sitios diferentes en la misma cadena de globina, por mutaciones *de novo*, sobre un gen con una variante preexistente, o bien por entrecruzamiento de dos genes variantes.

- **Mutación con desplazamiento del marco de lectura (*"Frame shift mutation"*).** Se producen por deleciones o adiciones de una base, que crea a nivel de la misma, un desplazamiento del marco de lectura y con ello nuevos codones, p. ej., la Hb Wayne se produce por la deleción de una base a nivel del triplete AAA (lisina) en la posición 139 de la cadena α y la Hb Cranston, a la cual se adicionan dos nuevas bases (AG) al codón AAG en la posición 144 de la cadena β.

- **Deleciones e inserciones sin desplazamientos en la lectura.** Estas mutaciones se producen por la pérdida o adición de codones completos, por lo cual no se producen desplazamientos en el marco de lectura, ni efectos sobre el resto de los aminoácidos. Habitualmente las globinas son inestables y pierden su longitud normal. Son ejemplos, la Hb Gun Hill, que presentan deleción de los aminoácidos 91-95 en la cadena β o la Hb Grady la cual extiende la cadena α en 3 aminoácidos.

- **Fusión de genes.** Los ejemplos son, la Hb Lepore (fusión δβ) y la Hb Kenya (fusión γβ).

- **Sustitución de una base en el codón de terminación de la cadena.** Hb Costant-Spring, donde una mutación en el codón de término genera una cadena α, con 31 aminoácidos más que la cadena normal.

- **Mutaciones que provocan término precoz de la síntesis de cadenas:** Se ha descrito en una variante donde faltan los dos residuos finales de la cadena β, con el resto de la cadena normal. Es el caso de la Hb M^c Kees Rocks, producida por una mutación de A o G por U en la tercera base del codón UAU que codifica para tirosina en la posición 145, produciéndose un codón de término (UAA o UAG). La Hb M^c Kees Rocks presenta aumento de la afinidad por el oxígeno y cursa con policitemia leve-moderada.

b) Clasificación clínica. El extenso listado de variantes de hemoglobinas (>1.400), descritas a la fecha, resultan fáciles de comprender si estas son clasificadas de acuerdo a sus manifestaciones clínicas (tabla 23-16). La mayor parte de las variantes son asintomáticas, muchas de ellas fueron descubiertas de forma accidental o en el curso de estudios étnicos. En regiones donde no están presentes, las variantes estructurales más frecuentes son S, C o E. Cuando las HbP estructurales presentan síntomas, estos pueden ser cianosis, policitemia o hemólisis.

Tabla 23-16. Clasificación clínica de las hemoglobinopatías estructurales

Asintomáticas (la mayoría)
Portadores Hb S, Hb C, Hb D y Hb E

Anemia hemolítica

Enfermedad de células falciformes
Hb SS, Hb SC, Hb SD Los Angeles, Hb SO Arab y S/talasemia-β

Hemoglobinas inestables
Torino, Setif, St Louis, Philadelphia, Zurich, Köln Hammersmith, Sabine, Gun Hill, Brockton, F Poole, Moscva, Prato, J Guantanamo, Chile, Olmsted, , Philly, Peterborough, Stanmore, Lombard, Contaldo, Foggia, Hirosaki, Groene Hart, Terre Haute y Auckland.

Hb que producen policitemia.
Hemoglobinas con alta afinidad por el O_2
J-Capetown, Suresnes, Creteil y Kempsey Chesapeake, Kempsey, Hiroshima, York Cowtown, San Diego, Rahere, Providence y Helsinki.

Hb que producen cianosis
Hemoglobinas con baja afinidad por el 02
Kansas, Beth Israel, St. Mandé, Vigo y Titusville

Hemoglobinas M
M-Boston, M-Osaka, M-Iwate, St. Luis, M-Saskatoon, M-Milwaukee-1, M-Hyde Park, MF- Fort Ripley y MF-Osaka.

Hemoglobinopatías talasémicas

Con fenotipo de talasemia-β
Hb Lepore
Alteraciones en el procesamiento del RNA: Hb E, Hb Knossos y Hb Malay
Globinas hiperinestables: Hb Geneva y Hb Westdale

Con fenotipo de talasemia-α
Término prematuro de la síntesis: Hb Constant Spring Hb Icaria, Hb Seal Rock y Hb Koya Dora
Globinas hiperinestables: Quong Sze

c) Clasificación según la patología molecular

Las manifestaciones clínicas de las HbP estructurales, pueden llegar a entenderse mejor, si el lugar y el tipo de aminoácido sustituido, se produce en puntos críticos para la función o propiedades de las globinas. A este respecto, se clasifican en tres grupos:

- **Sustitución de un aminoácido externo (polar) en la superficie de la molécula.** Solo en algunos casos de heterocigotos, dan lugar a anemias hemolíticas. Las más frecuentes son Hb S, C, D y E.

- **Sustitución de un aminoácido interno (no polar).** En términos generales la sustitución de un aminoácido interno resulta en una anomalía severa en la estructura y función de las globinas. Dentro de este grupo se encuentran las Hbi, Hemoglobina M (Hb M) y hemoglobinas con alteraciones en la afinidad por el oxígeno. La sustitución de un aminoácido hidrofóbico por otro de igual característica, es menos grave que el reemplazo de un hidrofóbico por uno hidrofílico, cuyo cuadro hemolítico es más intenso.

- **Cambios en las zonas de contacto entre subunidades ($\alpha_1\beta_1$) y ($\alpha_2\beta_2$).** Estos cambios pueden debilitar la molécula de Hb, haciéndola inestable y en otros casos puede alterar la colaboración hemo-hemo y aumentar o disminuir la afinidad por el oxígeno.

6.4.4. Hemoglobinopatías estructurales más frecuentes

a) Hemoglobina S o β6 (A3) Glu→Val. La prevalencia más alta de Hb S se encuentra en África tropical y entre los habitantes de raza negra o mestizos, de aquellos países que participaron en la trata transatlántica de esclavos hasta el siglo XVIII. Se presentan con baja frecuencia en la cuenca del mediterráneo, Arabia Saudita y regiones del subcontinente Indio. Los estudios genómicos, sugieren su origen en tres mutaciones independientes en el África tropical la primera y más frecuente se encuentra en Benín (cercano a Nigeria), África Central y Occidental. Una segunda mutación es frecuente en Senegal y la costa africana occidental y la tercera en la República Centroafricana. Estas mismas mutaciones se asocian con el gen β^S en afroamericanos y Afroestadounidenses descendientes de isleños. Solo los haplotipos de Benín y Senegal son prevalentes entre norafricanos, griegos e italianos y, sugieren que la mutación β^S, se diseminó a esos países desde África Occidental.

En algunas áreas de África, hasta el 45% de la población presenta el rasgo falciforme. En los Estados Unidos, América Latina y el Caribe, aproximadamente 8% de la población negra poseen el rasgo. La Anemia de Células Falciformes (ACF) tiene una incidencia de 1/600 recién nacidos en Estados Unidos y en algunas regiones de España alcanza una incidencia de 1/5.000 neonatos. En Chile, aún cuando el diagnóstico de ACF ha aumentado por la crisis migratoria (Venezuela, Haití y Colombia), esta todavía se mantiene como enfermedad poco frecuente.

Fisiopatología. En condiciones de saturación de oxígeno normal, la Hb S es tan soluble como la Hb A, pero disminuye cuando cae la presión de oxígeno en sangre. De esta forma, cuando la Hb adquiere el estado desoxi-Hb, la Hb S, polimeriza longitudinalmente deformando y transformando los eritrocitos en drepanocitos. La polimerización de Hb S induce la síntesis de $O_2^{\bullet -}$, que produce daño oxidativo en la membrana por 1) aumento de la expresión de FS en la membrana, la cual activa la coagulación y mecanismos de hipercoagulabilidad y 2) aumenta la permeabilidad al calcio, que activa canales de Gardos y cotransportadores de K+ y Cl– (estrés osmótico); desequilibrio que es parcialmente compensado por deshidratación del GR. El daño en la membrana provoca la lisis del GR y liberación de la Hb S al plasma, esta se une e inactiva el óxido nítrico (ON), produciendo vasoconstricción. La rigidez del drepanocito, aumenta de su adhesión al endotelio, disminuye el flujo sanguíneo, induce hipoxia, lesión vascular, inflamación y daño orgánico. El daño endotelial provoca aumento de la expresión de moléculas de adhesión, que aumenta la adhesión de drepanocitos y leucocitos al endotelio vascular.

Los drepanocitos, con baja capacidad de deformabilidad (produce AH extravascular), son al mismo tiempo frágiles y cuando obstruyen los capilares (microinfartos generalizados), se fragmentan causando un cuadro de AH intravascular. La combinación de las crisis vasooclusivas (dolor óseo intenso) y hemolíticas, junto con las complicaciones derivadas de estas, dan lugar a un cuadro clínico grave denominado síndrome falciforme (SFF). La gravedad del SFF depende de la intensidad de la falciformación y del aumento de la concentración de Hb F (que no sufre falciformación) y sustituye la Hb A, disminuyendo la intensidad del cuadro clínico. Por ello, la administración de hidroxiurea, que aumenta la Hb F y ON (también disminuye la expresión de moléculas de adhesión y los recuentos de reticulocitos, plaquetas y leucocitos) constituye la opción terapéutica de elección en el SFF.

La forma heterocigota de Hb AS, no asociada a otro gen de HbP o de talasemia, es prácticamente asintomática. Las crisis propias del SFF, solo se presentan en las formas homocigotas de Hb S o en heterocigotos, donde el alelo mutado de la Hb S coexiste con otros alelos mutados de HbP (p. ej., Hb C) o de talasemias (Hb S/talasemia-β).

El SFF es una urgencia médica, caracterizada por anemia crónica moderada-severa, que evoluciona con periodos de agudización o crisis, acompañadas de episodios vasooclusivos, especialmente en bazo, hígado, pulmón, huesos y cerebro. La gravedad del cuadro clínico depende de la intensidad de las crisis vasooclusivas, desencadenada por acúmulos de drepanocitos y disfunción endotelial. Si SFF afecta la circulación cerebral, puede dar origen a trastornos neurológicos graves. A nivel óseo, provoca infartos en las vértebras y cabeza del fémur (necrosis aséptica) o con cierta frecuencia osteomielitis por Salmonella. Las manifestaciones viscerales pueden afectar prácticamente a todos los órganos; es frecuente la hipertensión pulmonar, los abscesos hepáticos y los trastornos visuales (infartos en la circulación de la retina). El acúmulo de drepanocitos (rígidos) en capilares

periféricos con insuficiente circulación de retorno, pueden favorecer la aparición de úlceras crónicas, especialmente en las extremidades inferiores (úlceras maleolares). Finalmente, es relevante volver a señalar que el estado heterocigoto es generalmente asintomático y confiere protección a la malaria.

Diagnóstico. El SFF es fácilmente diagnosticado por la presencia de anemia severa con reticulocitosis y eritroblastosis. La poiquilocitosis es moderada-severa (drepanocitos, holly leaft, equinocitos, codocitos y pre-queratocitos) y puede coexistir con inclusiones como cuerpos de Howell-Jolly y Pappenheimer. En algunos casos se puede detectar neutrofilia y trombocitosis.

Para el diagnóstico confirmatorio se utiliza HPLC para detectar la Hb S (tiempo de retención 4,4 minutos) y/o electroforesis capilar (migración en la zona Z5). Alternativamente por técnicas de secuenciación de DNA, se puede detectar el cambio en el codón 6 GAG por GTG (cambio de ácido glutámico por valina).

Tratamiento. El tratamiento de los SFF está orientado a disminuir el riesgo de: infecciones, deshidratación, hipoxia, ejercicio, estasis circulatorio y la exposición a baja temperatura. La Hidroxiurea es el tratamiento de elección en niños y pacientes jóvenes. Otras estrategias terapéuticas son la inhibición de la P-selectina (Crizanlizumab) o la disminución de la falciformación, aumentando la afinidad del oxígeno por la hemoglobina (Voxelator). En casos de SFF muy severos se puede plantear el trasplante de progenitores hematopoyéticos, que de ser exitoso supone la curación de la enfermedad.

b) Hemoglobina C o β6 (A3) Glu→Lys. Su importancia clínica es mucho menor que la de la Hb S, porque no presenta manifestaciones tan graves como el SFF, excepto cuando coexisten con un gen de la Hb S. Por ello, ante un SFF, es muy importante el diagnóstico confirmatorio, para no confundir una hemoglobinopatía S homocigota, con estados doble heterocigotos de Hb S, con otras HbP.

La Hb C es una HbP propia del occidente de África; aunque hay menos evidencia que la Hb S, su distribución geográfica sugiere un rol protector contra la malaria.

- **Rasgo de Hemoglobina C (AC).** El estado heterocigoto es asintomático. Los pacientes con Hb AC son identificados a través de programas de screening para Hb S.

- **Enfermedad por Hemoglobina CC.** El estado heterocigoto (Hb AC) es asintomático, mientras que el homocigoto (Hb CC) se acompaña de esplenomegalia, colelitiasis y un cuadro de anemia hemolítica moderada-crónica con abundantes codocitos y escasos esferocitos. La disminución de la vida media del GR está relacionada con la disminución en la solubilidad de la desoxi-hemoglobina C. Los agregados intracelulares de Hb C (cristales octaédricos, romboidales o hexagonales), limitan la deformabilidad del eritrocito, predisponiendo su fragmentación y destrucción por acondicionamiento esplénico. En el análisis

por HPLC, la Hb C y Hb A2 presentan el mismo tiempo de retención, por lo que, su separación y cuantificación relativa es posible solo con electroforesis capilar (migración en zona Z2 y Z3 respectivamente).

- **Enfermedad por Hemoglobina SC.** Resulta de la herencia de un gen S de un padre y un gen C del otro. Los eritrocitos contienen aproximadamente igual proporción de Hb C y S, la Hb A está ausente y la Hb F es normal o levemente aumentada. En Ghana la enfermedad por Hb SC es tan prevalente como la anemia de células falciformes y en algunas regiones afecta hasta el 25% de la población, mientras que en afroamericanos se presenta con una tasa de 1:1.000.

  La enfermedad por Hb SC cursa con SFF, pero es menos severo que en la anemia de células falciformes (SS). Los síntomas durante el primer año de vida son escasos y el 25% de los individuos afectados permanecen asintomáticos durante la primera década de la vida. La esplenomegalia se observa frecuentemente en niños, y aunque la perfusión de órganos está intacta su función está comprometida, siendo de menor cuantía, más gradual y a edades más tardías que en la anemia de células falciformes.

  También son frecuentes y en una proporción mayor a la Hb SS, la retinopatía, necrosis aséptica de la cabeza femoral y síndrome torácico agudo, por embolia grasa luego del infarto de médula ósea.

  La anemia es moderada con alta proporción de codocitos, son poco frecuentes los cristales de Hb C, el VCM está disminuido y la CHCM puede estar aumentada por deshidratación celular.

c) Hemoglobina D (D-Los Ángeles, D-Punjab) o β121 (GH 4) Glu→Gln. Existen al menos once variantes de cadena β y seis de cadenas α que tienen las características electroforéticas y de solubilidad similar a las Hb D y G. La Hb D-Punjab, también denominada Hb D-Los Ángeles, se distingue de la Hb S, por su solubilidad normal y porque no produce falciformación. Se presentan con una frecuencia de 1-3% en India occidental y con una baja proporción en comunidades europeas con lazos coloniales con india. En Estados Unidos, la variante más prevalente es la Hb G-Philadelphia, una variante de cadena α encontrada especialmente en afroamericanos.

- **Rasgo de Hemoglobina AD.** El estado heterocigoto generalmente es asintomático. Los pacientes con Hb AD son identificados a través de programas de screening para Hb S.

- **Enfermedad por Hemoglobina DD.** Se caracteriza por anemia hemolítica moderada y esplenomegalia. El análisis de hemoglobinas muestra 95% de Hb D con Hb F y A2 normales.

- **Enfermedad por Hemoglobina SD.** De las variantes señaladas, nueve de ellas se asocian con Hb S. Con excepción de la Hb D-Punjab, los estados dobles

heterocigotos para Hb S, D o G son asintomáticos. La Hb D-Punjab interactúa con la Hb S produciendo anemia hemolítica moderada y síntomas moderados similares a la anemia por células falciformes.

d) Hemoglobina E o β26 (B8) Glu→Lys. Es la segunda variante estructural más prevalente en el mundo.

Es relativamente frecuente en el Sudeste de Asia y, en estado homocigoto, cursa con síndrome anémico leve de características superponibles a la β-talasemia heterocigota. De hecho, es una HbP talasémica, es decir, que la mutación, además de ser estructural, genera una disminución de síntesis de cadenas β. En estado heterocigoto muestra microcitosis moderada sin anemia, que puede pasar inadvertida desde el punto de vista clínico. La diseminación de la variante a Norteamérica fue producto de la inmigración Indochina a los Estados Unidos al final de la década del 70.

El análisis de las hemoglobinas por HPLC, muestra que la Hb E, posee el mismo tiempo de retención que la Hb A2, por lo que, su separación y cuantificación relativa, es posible solo con electroforesis capilar (migración en zona Z4 y Z3 respectivamente).

- **Rasgo de Hemoglobina AE.** Aun cuando es clínicamente asintomática, presenta policitemia, microcitosis moderada, presencia de codocitos y 20% de Hb E.

- **Enfermedad por Hemoglobina EE.** Se caracteriza por anemia asintomática, con microcitosis y regular cantidad de codocitos. El estudio de hemoglobinas muestra ~90% de Hb E y Hb F normal o levemente aumentada. El acortamiento de la sobrevida del glóbulo rojo puede resultar en parte por la inestabilidad de la Hb E, una propiedad atribuida a la tendencia de los dímeros β^E a disociarse en monómeros, exponiendo así los grupos SH reactivos.

- **Enfermedad por Hemoglobina SE.** El fenotipo clínico parece ser relativamente leve, similar a la Hb S/talasemia-β^+; sin embargo, se han descrito crisis vasooclusivas, síndrome torácico agudo, secuestro esplénico, rabdomiolisis y necrosis aséptica de la cabeza femoral.

e) Hemoglobina O-Arab o β121 Glu→Lys. Se denomina así, debido a que el primer caso se identificó en un niño árabe y en asociación con Hb S. También ha sido encontrada en afroamericanos, Jamaica, Sudán, Arabia Saudita, Yugoslavia, Bulgaria, Egipto y Grecia. Esta variante probablemente es originaria de África y emigró hacia el Medio Oriente. Tiene una movilidad electroforética similar a la Hb C a pH alcalino, pero se desplaza con la Hb S en agar citrato a pH ácido. El estado heterocigoto y el doble heterocigoto para Hb O-Arab y C son asintomáticos.

- **Hemoglobina O-Arab homocigota.** Se caracteriza por anemia hemolítica moderada con poiquilocitosis (codocitos) y esplenomegalia.

- **Enfermedad por Hb S/O-Arab.** A nivel clínico y hematológico es indistinguible de la anemia de células falciformes. La asplenia funcional precoz, es seguida por infartos esplénicos progresivos y riesgo de infección.

f) Hemoglobinas inestables y enfermedad por hemoglobinopatías inestables. Su característica principal es la precipitación de la variante inestable, lo que produce anemia hemolítica crónica secundaria a daño en membrana inducido por CH. Algunas son severamente inestables y precipitan inmediatamente luego de sintetizarse, p. ej., Hb Bristol, Hb Castilla y Hb Hammersmith. Otras son menos inestables y precipitan solo in vitro (Hb Hofu), pero el término de Hemoglobinas inestables (Hbi) se reserva solo para aquellas variantes cuya inestabilidad es suficiente para causar hemólisis en el paciente.

A pesar de que se han descrito más de 100 tipos de Hbi, la enfermedad por hemoglobinopatías inestables (EHbPi) son poco frecuentes; dentro de estas, la variante más frecuente es la Hb Köln que posee amplia distribución mundial y la Hb Hammersmith que ha sido descrita en pacientes de China, Japón y Reino Unido. La EHbPi, se expresa en su estado heterocigoto, ya que el patrón de herencia es autosómico dominante.

Defectos moleculares. Las Hbi son un grupo muy heterogéneo, su expresión clínica dependerá del grado de compromiso de la cadena de globina afectada, de la posición que ocupe la mutación y del tipo de aminoácido sustituido. Las Hbi, se pueden agrupar en:

- **Aquellas que debilitan las uniones del hemo con la globina.** Como se ha señalado, la unión del hemo a la globina contribuye a estabilizar su estructura terciaria. El hemo se inserta en una cavidad o "bolsillo" hidrofóbico en la parte interna de la globina, que contacta con algunos aminoácidos no polares en las regiones CD, E, F y FG. El debilitamiento de estas uniones se puede generar por:
  a) La sustitución de un aminoácido en la cavidad del hemo. Supone la pérdida del enlace entre ambos como ocurre en la Hb Sydney o β67 (E11) Val→Ala, ya que el aminoácido sustituido aumenta su distancia con el hemo, debilitando la unión.
  b) Sustitución de aminoácidos apolares por polares en el interior de la cadena de globina. La estructura terciaria en las globinas orienta los aminoácidos con carga (Lys, Arg, Glu y Asp) hacia la superficie de la molécula, favoreciendo la formación de puentes de hidrógeno con el agua (solubilización). En contraste, los aminoácidos de la estructura interna de las globinas son apolares y estabilizan el grupo Hemo a través de interacciones hidrofóbicas. El cambio en alguno de estos aminoácidos podría facilitar la entrada de agua y la formación de Hb M. Un ejemplo es la Hb Estambul o β92 (F8) His→Gln. La sustitución del aminoácido que se une directamente al hemo provoca la ruptura del enlace y la pérdida del grupo hemo. Apro-

ximadamente un tercio de las Hbi incluyen la sustitución de un aminoácido cargado.

c) Deleciones de aminoácidos. Las deleciones de un grupo de aminoácidos puede condicionar la unión del hemo a las globinas, así p. ej., la deleción de cinco aminoácidos en la Hb Gun Hill o β91(F7)-95(FG2)Leu-His-Cys-Asp-Lys→0, que incluye la pérdida de la histidina en posición 92 y por tanto la pérdida de la capacidad de unión al hemo.

- **Alteración de la estructura cuaternaria de la hemoglobina.** Como ya se señaló, las cadenas de globinas establecen puentes de unión con cadenas homólogas y no homólogas. El cambio de un aminoácido por otro en estas zonas puede distorsionar el tetrámero de hemoglobina, formando dímeros o monómeros con inestabilidad variable. Las mutaciones que afectan la interacción $\alpha_1\beta_1$ (Hb Khartoum, Philly y Tacoma) por lo general son más inestables, que aquellas donde se afecta la interacción $\alpha_1\beta_2$. Los dímeros de cadenas $\alpha\beta$ y las cadenas de globinas aisladas, desde luego no funcionales, son además vulnerables a la oxidación, formación de hemicromos y en consecuencia los efectos que estos producen sobre el eritrocito.

- **Alteración en la estructura helicoidal de las globinas.** La secuencia primaria de aminoácidos en una proteína determinará cómo se organizará su estructura secundaria. Así, algunos residuos de aminoácidos tienen mayor probabilidad que otros para formar la estructura α-hélice o β-plegada. Por ejemplo, el nitrógeno de la prolina (amina secundaria) está unido a su cadena lateral formando un anillo, lo cual le impide formar puentes de hidrógeno con otros aminoácidos, por lo que su presencia interrumpe la estructura α-hélice, excepto cuando se encuentra entre el primer-tercer residuo de una α-hélice, en el extremo de hojas beta o giros beta. En consecuencia, el cambio de un aminoácido de la hélice por prolina, distorsionará la estructura de la hélice, cuya gravedad dependerá del punto donde ha tenido lugar la sustitución.

Mecanismo de hemólisis. El acortamiento de la vida media del eritrocito está mediado por dos mecanismos: la formación de hemicromos o CH, que precipitan e inducen daño oxidativo en la membrana. Los CH, al unirse a la membrana del eritrocito por enlaces hidrofóbicos, limitan su capacidad de deformabilidad y son removidos por el SFM del bazo, mecanismo que contribuye directamente al desarrollo de AHE.

Biosíntesis. La concentración relativa de Hbi en pacientes heterocigotos es en general considerablemente menor que en las variantes estables. En pacientes con Hbi de cadenas β, estas representan menos del 30% del total de Hb, en el caso de Hbi de cadenas α representan menos del 20%. La explicación más probable para la disminución de la Hbi es el aumento de la proteólisis de las variantes de globina, antes de su incorporación a los tetrámeros de Hb.

Herencia. Es similar al de las demás hemoglobinas estructurales. Hasta la fecha no se han reportado estados homocigotos, pero sí con relativa frecuencia casos debidos a mutaciones de novo.

Clínica. Se han descrito más de 100 variantes de Hbi, el 25% de ellas son asintomáticas (sin significado clínico) y menos del 10% presentan anemia hemolítica neonatal severa. Gran parte de estas son variantes de cadena β, se producen por mutaciones *de novo* que comprometen progresivamente el estado clínico del paciente, a medida que la síntesis de Hb F disminuye; estas variantes presentan anemia severa (< 7 g/dL), reticulocitosis (>30%) y la esplenectomía no mejora significativamente la sintomatología.

El 10% de las variantes, presentan AH moderada, que puede agudizarse en presencia de episodios febriles (Hbi termolábil) o ingesta de medicamentos oxidantes (como el déficit de G6FD). El diagnóstico habitualmente se retrasa hasta la infancia tardía o adolescencia. En el examen físico se encuentra ictericia intermitente, esplenomegalia y colelitiasis. La esplenectomía mejora significativamente la sintomatología.

La mayoría de las variantes presentan AH leve o compensada, reticulocitosis leve (4-10%) y ausencia de esplenomegalia. El diagnóstico debe sospecharse ante una hemólisis crónica de carácter familiar, desencadenada o agravada por infecciones, estados febriles o la ingesta de ciertos medicamentos (como sucede en el déficit de G6FD, pero menos evidente).

En algunas variantes inestables, los síntomas del síndrome anémico no correlacionan con la concentración de Hb, debido al cambio en la afinidad de las Hbi por el oxígeno. Algunas de ellas presentan baja afinidad, permitiendo una oxigenación tisular más eficiente, en comparación con otras, en que aumenta la afinidad y predisponen a la formación de Hb M, policitemia y cianosis, entre estas se pueden señalar: Hb Freiburg, Hb St Louis y Hb Chile.

Diagnóstico. Los pacientes con Hbi, pueden presentar orina oscura o pigmenturia, que es el resultado de la presencia de dipirroles que tienen su origen en los CH. La ausencia de pigmenturia no excluye el diagnóstico de Hbi y la severidad de la AH, no está relacionada con esta (p. ej., Hb Köln y Hb Zurich).

A diferencia de otras HbP y el aporte de la HPLC en el diagnóstico, en el caso de las Hbi, solo algunas de ellas presentan tiempos de retención característicos que permitirán el diagnóstico (Hb Köln, Hb Zurich y Hb Hasharon).

A nivel morfológico, las alteraciones son inespecíficas e incluyen anisocitosis, punteado basófilo, cuerpos de Howell-Jolly, eritroblastos, *bite cells* y esferocitos. La CHCM se encuentra disminuida, debido a la pérdida de hemo y la formación de CH (que no se deben confundir con reticulocitos).

La prueba de isopropanol, es una prueba útil para detección de Hbi, pero puede presentar resultados falsos positivos, cuando la Hb F es >5%. En la prueba de desnaturalización por calor, el hemolizado se incuba durante 1-2 horas a 50 °C y el desarrollo de un precipitado visible, sugiere la presencia de Hbi. Si los estudios clínicos y hematológicos sugieren una variante inestable, la detección del defecto molecular se convierte en el paso final del diagnóstico.

Tratamiento. Depende de la gravedad de la anemia, en caso de anemia severa puede ser necesaria la esplenectomía. No obstante, la mayoría de los pacientes, requieren solo suplementación con folatos y evitar la exposición a situaciones o compuestos oxidantes.

g) **Hemoglobinopatías con alteración de la afinidad por el oxígeno.** Se producen por mutaciones en las cadenas de globinas, que se traducen en una mayor o menor afinidad de la hemoglobina por el oxígeno, comprometiendo su liberación a los tejidos. La afinidad puede estar afectada por dos mecanismos principales (a) sustitución de aminoácidos en regiones de la globina que provocan aumento o disminución de la afinidad por el oxígeno y (b) sustitución de un aminoácido próximo al grupo hemo, que produce metahemoglobinas (Hemoglobinas M)

- **Variantes con aumento de la afinidad por el oxígeno.** Es la forma más frecuente, la mayoría de los casos se heredan de forma autosómica dominante, exceptuando algunos casos producidos por mutaciones espontáneas. Las variantes presentan sustituciones de aminoácidos, en una de las tres regiones fundamentales para el transporte de oxígeno (1) la interface $\alpha_1\beta_2$, (2) el C-terminal de la cadena β y (3) la zona de unión para el 2,3 DFG.

  El aumento de la afinidad de la Hb por el oxígeno, provoca hipoxia tisular, que estimula la síntesis de eritropoyetina y, con ello el desarrollo de poliglobulia con aumento de la viscosidad sanguínea. Los signos clínicos y de laboratorio permitirán el diagnóstico diferencial con otras causas de poliglobulia, entre estos la juventud del paciente, la ausencia de esplenomegalia y los antecedentes familiares de poliglobulia. El diagnóstico confirmatorio requiere el análisis de Hb por HPLC y electroforesis capilar, sin embargo, la ausencia de variantes de Hb, no descarta el diagnóstico, para ello la medición de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno, con disminución del p50, confirmará el diagnóstico.

- **Variantes con disminución de la afinidad por el oxígeno.** En general son asintomáticas, o están acompañadas de cianosis y anemia leve, que es compensatoria al aumento de la efectividad de la Hb variante, en la entrega de oxígeno a los tejidos. El estudio de gases arteriales, muestra una disminución de la saturación arterial de O_2 y aumento de la pO_2. Sin embargo, el estudio de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno es también un criterio diagnóstico fundamental, ya que constituye el único método para demostrar la disminución de la afinidad por el oxígeno o el aumento del p50.

Las Hb variantes: Kansas, Beth Israel y St. Mandé, la sustitución afecta al mismo aminoácido (β102 asparragina) situado en la interface $\alpha_1\beta_2$, que en condiciones normales cuando la Hb está oxigenada, forma entre estas un puente de hidrógeno con el ácido aspártico α94. Si la unión no se forma la hemoglobina se disocia formando dímeros αβ.

- **Hemoglobinas M.** Se producen por mutaciones en los genes de globinas, que se heredan de forma autosómica dominante, estas alteran el estado de oxidación del hierro hemínico, favoreciendo su forma oxidada lo cual transforma la Hb funcional en Hb M, incapaz de transportar oxígeno. La anomalía molecular se produce por la sustitución de la histidina distal (E7) o proximal (F8) por tirosina, cuya cadena lateral al ser más larga para enlazarse al Fe^{2+}, a través de una unión covalente, la hace más estable en su forma oxidada o Fe^{3+}.

  En condiciones fisiológicas, el hierro de la Hb se encuentra en estado Fe^{2+} y, solo menos del 1% se encuentra oxidado, esto es gracias al sistema diaforasa-citocromo b5 reductasa, que mantiene permanentemente reducido el Fe^{3+}.

  Se han descrito seis tipos de Hb M, que muestran sustitución de la histidina E7 o F8 por tirosina en distintos tipos de cadenas de globina: Hb M-Boston: α58 (E7) His→Tyr, Hb M-Iwate: α87 (F8) His→Tyr, Hb M-Saskatoon: β63 (E7) His→Tyr, Hb M-Hyde Park: β92 (F8) His→Tyr, Hb M-Milwaukee: β67 (E11) Val→Glu, Hb FM-Osaka: ^{G}γ63 (E7) His→Tyr, y HB FM-Fort Ripley: ^{G}γ92 (F8) His→Tyr. La reacción de equilibrio del oxígeno con las Hb M, depende de la histidina proximal/distal sustituida y del tipo de cadena afectada. Así las de cadena α M-Boston y M-Iwate, en las cuales solo la cadena β reacciona con el O_2 tienen una baja afinidad por el O_2; mientras que las variantes de cadena β, en las que solo transportan O_2 las cadenas α, tienen un p50 prácticamente normal.

  La única manifestación clínica de las Hb M hereditarias es la cianosis permanente desde el nacimiento, cuando la alteración se encuentra en la cadena α, o a partir de los seis meses si está en la cadena β. La cianosis es también irreversible al efecto del azul de metileno, que la diferencia del déficit de citocromo b_5 reductasa, donde la administración de azul de metileno disminuye o minimiza la cianosis.

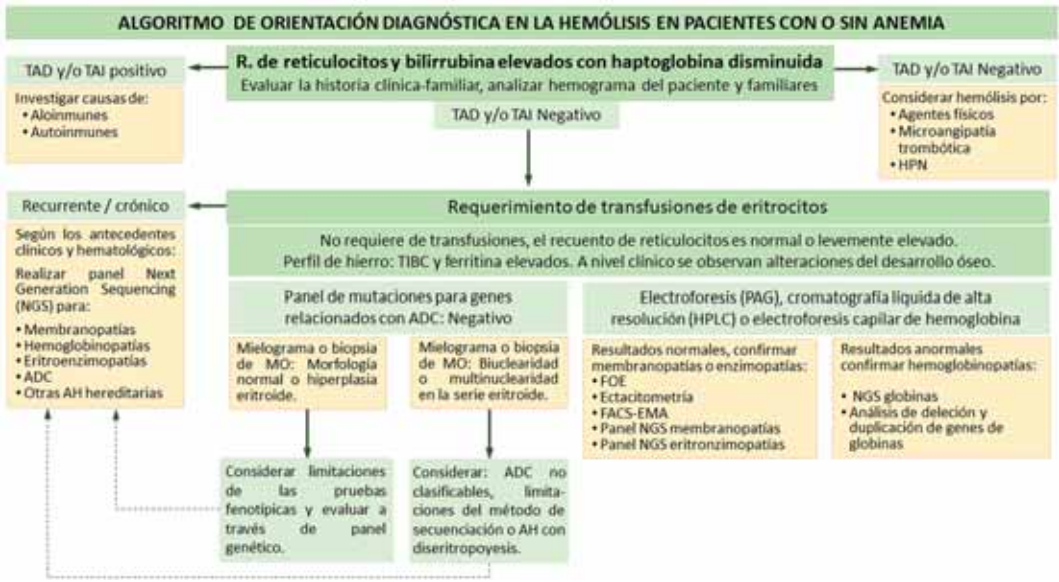

ALGORITMO DE ORIENTACIÓN DIAGNÓSTICA EN LA HEMÓLISIS EN PACIENTES CON O SIN ANEMIA
R. de reticulocitos y bilirrubina elevados con haptoglobina disminuida
Evaluar la historia clínica-familiar, analizar hemograma del paciente y familiares
TAD y/o TAI positivo
Investigar causas de:
• Aloinmunes
• Autoinmunes
TAD y/o TAI Negativo
TAD y/o TAI Negativo
Considerar hemólisis por:
• Agentes físicos
• Microangipatía trombótica
• HPN
Requerimiento de transfusiones de eritrocitos
Recurrente / crónico
Según los antecedentes clínicos y hematológicos:
Realizar panel Next Generation Sequencing (NGS) para:
• Membranopatías
• Hemoglobinopatías
• Eritroenzimopatías
• ADC
• Otras AH hereditarias
No requiere de transfusiones, el recuento de reticulocitos es normal o levemente elevado.
Perfil de hierro: TIBC y ferritina elevados. A nivel clínico se observan alteraciones del desarrollo óseo.
Panel de mutaciones para genes relacionados con ADC: Negativo
Electroforesis (PAG), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o electroforesis capilar de hemoglobina
Mielograma o biopsia de MO: Morfología normal o hiperplasia eritroide.
Mielograma o biopsia de MO: Biuclearidad o multinuclearidad en la serie eritroide.
Resultados normales, confirmar membranopatías o enzimopatías:
• FOE
• Ectacitometría
• FACS-EMA
• Panel NGS membranopatías
• Panel NGS eritronzimopatías
Resultados anormales confirmar hemoglobinopatías:
• NGS globinas
• Análisis de deleción y duplicación de genes de globinas
Considerar limitaciones de las pruebas fenotípicas y evaluar a través de panel genético.
Considerar: ADC no clasificables, limitaciones del método de secuenciación o AH con diseritropoyesis.

Figura 23-23. Algoritmo diagnóstico anemias hemolíticas con énfasis en anemias hemolíticas intracorpusculares.

7. LECTURAS SUGERIDAS

Balasubramaniam S, Duley JA, and Christodoulou J. Inborn errors of purine metabolism: clinical update and therapies. *J Inherit Metab Dis* 37: 669-686, 2014.

DeBaun MR, Jordan LC, King AA, Schatz J, Vichinsky E, Fox CK, McKinstry RC, Telfer P, Kraut MA, Daraz L, Kirkham FJ, and Murad MH. American Society of Hematology 2020 guidelines for sickle cell disease: prevention, diagnosis, and treatment of cerebrovascular disease in children and adults. *Blood Adv* 4: 1554-1588, 2020.

Howes RE, Piel FB, Patil AP, Nyangiri OA, Gething PW, Dewi M, Hogg MM, Battle KE, Padilla CD, Baird JK, and Hay SI. G6PD deficiency prevalence and estimates of affected populations in malaria endemic countries: a geostatistical model-based map. *PLoS Med* 9: e1001339, 2012.

Iolascon A, Heimpel H, Wahlin A, and Tamary H. Congenital dyserythropoietic anemias: molecular insights and diagnostic approach. *Blood* 122: 2162-2166, 2013.

King MJ, Garcon L, Hoyer JD, Iolascon A, Picard V, Stewart G, Bianchi P, Lee SH, and Zanella A. ICSH guidelines for the laboratory diagnosis of nonimmune hereditary red cell membrane disorders. *Int J Lab Hematol* 37: 304-325, 2015.

Koralkova P, van Solinge WW, and van Wijk R. Rare hereditary red blood cell enzymopathies associated with hemolytic anemia - pathophysiology, clinical aspects, and laboratory diagnosis. *Int J Lab Hematol* 36: 388-397, 2014.

Li J, Lin Y, Chen L, Qin L, Tan H, Zou J, Zhang D, Nie Y, Wang G, Zhang H, Liu E, Chen X, and Ru K. Identification of acquired PIGA mutations and additional variants by next-generation sequencing in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Int J Lab Hematol* 42: 473-481, 2020.

Luzzatto L, and Arese P. Favism and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. N *Engl J Med* 378: 60-71, 2018.

Minucci A, Moradkhani K, Hwang MJ, Zuppi C, Giardina B, and Capoluongo E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations database: review of the "old" and update of the new mutations. *Blood Cells Mol Dis* 48: 154-165, 2012.

Perrotta S, Gallagher PG, and Mohandas N. Hereditary spherocytosis. *Lancet* 372: 1411-1426, 2008.

Piel FB, Steinberg MH, and Rees DC. Sickle Cell Disease. *N Engl J Med* 376: 1561-1573, 2017
DeLoughery TG. Microcytic anemia. *N Engl J Med* 371: 2537, 2014.

Risinger M, and Kalfa TA. Red cell membrane disorders: structure meets function. *Blood* 136: 1250-1261, 2020.

Ryan K, Bain BJ, Worthington D, James J, Plews D, Mason A, Roper D, Rees DC, de la Salle B, and Streetly A. Significant haemoglobinopathies: guidelines for screening and diagnosis. *Br J Haematol* 149: 35-49, 2010.

Saha S, Anilkumar AA, and Mayor S. GPI-anchored protein organization and dynamics at the cell surface. *J Lipid Res* 57: 159-175, 2016.

Stephens AD, Colah R, Fucharoen S, Hoyer J, Keren D, McFarlane A, Perrett D, and Wild BJ. ICSH recommendations for assessing automated high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis equipment for the quantitation of HbA2. *Int J Lab Hematol* 37: 577-582, 2015.

Taher AT, Musallam KM, and Cappellini MD. beta-Thalassemias. *N Engl J Med* 384: 727-743, 2021.

Taher AT, Weatherall DJ, and Cappellini MD. Thalassaemia. *Lancet* 391: 155-167, 2018.

Traeger-Synodinos J, Harteveld CL, Old JM, Petrou M, Galanello R, Giordano P, Angastioniotis M, De la Salle B, Henderson S, and May A. EMQN Best Practice Guidelines for molecular and haematology methods for carrier identification and prenatal diagnosis of the haemoglobinopathies. *Eur J Hum Genet* 23: 560, 2015.
Umqui ut autat. Solorib usdamen duciusam, occum labo. Ihiliciam num iusam, con res exerios as explicid eum arum acerum rerfere offici consendant essimus.

Capítulo

24

ANEMIAS HEMOLÍTICAS EXTRACORPUSCULARES

Marcela Vásquez, Mónica Maldonado e Iván Palomo

Resumen

1. Introducción

2. Anemias hemolíticas inmunes
- 2.1. Mecanismos de destrucción inmune de los eritrocitos
- 2.2. Antigénicos eritrocitarios
- 2.3. Anemias hemolíticas aloinmunes
  - 2.3.1. Enfermedad hemolítica del feto y recién nacido
  - 2.3.2. Reacción hemolítica transfusional
- 2.4. Anemias hemolíticas autoinmunes
  - 2.4.1. AHAI por anticuerpos calientes
  - 2.4.2. AHAI por anticuerpos fríos
  - 2..4.3. AHAI por mezcla de autoanticuerpos fríos y calientes, o tipo mixto
  - 2.4.4. AHAI inducida por fármacos

3. Anemias hemolíticas no imnunes

3.1. Agentes infecciosos
3.2. Venenos
3.3. Fármacos oxidantes
3.4. Agentes físicos
3.5. Productos químicos

4. Lecturas sugeridas

RESUMEN

Una importante clasificación de las anemias es según si la médula ósea produce la adecuada cantidad de glóbulos rojos, así existen anemias regenerativas y no regenerativas. Entre las primeras están las anemias hemolíticas, es decir destrucción de los hematíes. Esto puede ocurrir por alteración en el interior de los eritrocitos (Anemias hemolíticas intracorpusculares) o por una causa presente fuera de los glóbulos rojos (Anemias extracorpusculares). En este último caso la anemia hemolítica puede estar mediada por anticuerpos u otros mecanismos no inmunes.

Este capítulo tratará sobre las anemias hemolíticas extracorpusculares, tanto inmunes como no inmunes.

1. INTRODUCCIÓN

Normalmente la cantidad de glóbulos rojos circulante permanece dentro de rangos normales gracias a mecanismos de control. Los eritrocitos senescentes son retirados por el Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM) del bazo y por su parte la médula ósea diariamente libera hematíes a circulación.

Las anemias hemolíticas tienen en común la destrucción aumentada de los eritrocitos. Ello exige a la médula ósea a aumentar la producción de glóbulos rojos, ya que estos contienen hemoglobina, la que transporta el oxígeno desde los pulmones a los tejidos. Puede, dependiendo de la capacidad regenerativa de la médula ósea, ocurrir una anemia hemolítica compensada (síndrome hemolítico) o se desarrolla el cuadro clínico de anemia hemolítica.

Según su fisiopatología, las anemias hemolíticas se clasifican en (a) Anemias hemolíticas intracorpusculares, caracterizadas por la destrucción acelerada de los eritrocitos debido a un defecto, generalmente congénito de las mismas células y (b) Anemias hemolíticas extracorpusculares, en que el eritrocito es normal pero lo destruyen prematuramente factores externos.

Las anemias hemolíticas extracorpusculares, también llamadas anemias hemolíticas adquiridas, se definen como la reducción de la vida media de los eritrocitos mediada por defectos o situación extrínseca o externa al glóbulo rojo, las que pueden ser de etiología inmunes o no inmunes (tabla 24-1).

Tablas 24-1. Clasificación de las Anemias hemolíticas extracorpusculares

Inmunes
Anemias hemolíticas aloinmunes
Anemias hemolíticas autoinmunes
No inmunes
Agentes infecciosos
Venenos
Fármacos oxidantes
Agentes químicos
Agentes físicos
Mecánicas
Hemoglobinuria de la marcha
Coagulación intravascular diseminada
Físicas
Quemaduras extensas
Radiaciones
Congelación de extremidades

2. ANEMIAS HEMOLÍTICAS INMUNES

Las anemias hemolíticas inmunes (AHI), son un grupo de anemias hemolíticas adquiridas, que se producen por la reducción de la vida media de los glóbulos rojos como consecuencia del aumento de la destrucción celular a nivel periférico mediada por anticuerpos. La destrucción inmune de los eritrocitos se inicia con la unión de anticuerpos de clase IgG y/o IgM a estructuras antigénicas, de naturaleza proteica o hidrocarbonada, ubicados en la membrana eritroide.

La destrucción inmune de los eritrocitos puede ser consecuencia de un proceso aloinmune o autoinmune, lo que permite clasificar a las AHI en tres grandes categorías: Anemias hemolíticas aloinmunes, Anemias hemolíticas autoinmunes y Anemias Inducidas por fármacos. A su vez, las anemias autoinmunes han sido también clasificadas de acuerdo a la naturaleza específica del anticuerpo involucrado (tabla 24-2).

Tabla 24-2. Clasificación de la Anemias hemolíticas inmunes

Anemias hemolíticas aloinmunes
Enfermedad hemolítica del feto y recién nacido
Reacción hemolítica transfusional
Anemias hemolíticas autoinmunes
Por anticuerpos calientes
Primaria
Secundaria
Síndromes linfoproliferativos
Mesenquimopatías
Infecciones virales
Enfermedades inmunológicas
Por anticuerpos fríos
Enfermedad de aglutininas frías
Hemoglobinuria paroxística a frigore
Inducidas por fármacos

2.1. Mecanismos de destrucción inmune de los eritrocitos

La destrucción inmune de los glóbulos rojos circulantes puede ocurrir a nivel intravascular, es decir, al interior de los vasos sanguíneos o extravascular, si ella ocurre fuera de ellos en el SFM.

Hemólisis extravascular

La destrucción extravascular de los eritrocitos es un mecanismo en el cual los eritrocitos en circulación que están sensibilizados (recubiertos) con anticuerpos de clase IgG, IgM y/o IgA o fracciones del complemento, son reconocidos por células del sistema inmune y retirados de circulación por el SFM del bazo.

En este tipo de hemólisis, la destrucción globular se inicia con la unión del eritrocito sensibilizado a un macrófago, célula que tiene receptores para la región Fc de las IgG (FcγR), específicamente IgG1 e IgG3, y receptores para el fragmento C3b del complemento. La hemólisis puede ocurrir por tres mecanismos distintos (figura 24-1): (a) **Fagocitosis directa**, proceso en el cual el glóbulo rojo es fagocitado y lisado por el macrófago, (b) **Fragmentación**, proceso en el cual el glóbulo rojo es parcialmente fagocitado, perdiendo fragmentos de la membrana celular lo que genera un eritrocito alterado (esferocito) que permanece en circulación, y (c) **Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos**, proceso en el cual el glóbulo rojo sensibilizado es lisado extracelularmente por sustancia secretadas por el macrófago.

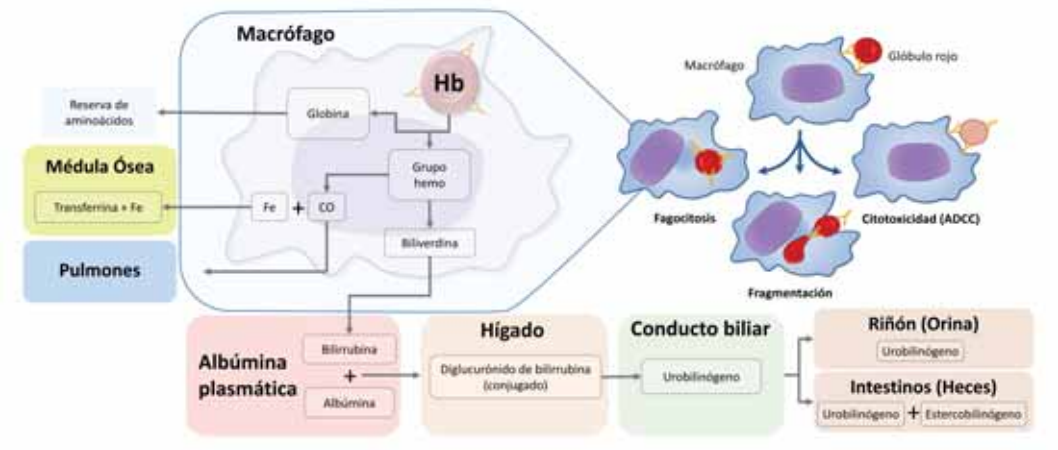


Figura 24-1. Esquema representativo de la hemólisis inmune extravascular.

La presencia de fragmentos del complemento en la membrana eritrocitaria (C4b, C2b y C3b), producto de la activación parcial del complemento, actúa sinérgicamente con la IgG aumentando la tasa de destrucción inmune.

En la destrucción extravascular de las células rojas, prácticamente no se produce liberación de hemoglobina al plasma, pero producto de la eritrofagocitosis se induce hipertrofia del SFM del bazo e hígado (hepatoesplenomegalia).

Hemólisis intravascular

La destrucción inmune intravascular de los eritrocitos ocurre cuando un anticuerpo principalmente de tipo IgM y algunas subclases de IgG, reconoce y se une a un antígeno presente en la membrana celular. El complejo inmune formado induce la activación de la cascada del complemento por la vía clásica, lo que implica la unión del complejo C1q a la inmunoglobulina. La activación total del complemento continua hasta la formación del complejo de ataque a membrana (C5b-9), lo que causa la lisis de los glóbulos rojos afectados.

La hemólisis intravascular, a diferencia de la extravascular, se manifiesta por liberación al torrente circulatorio de hemoglobina y otros componentes de los eritrocitos, lo que se va a evidenciar en hemoglobinemia. La hemoglobina en el plasma se une a la haptoglobina para formar un complejo que previene la excreción a nivel renal; cuando la haptoglobina es saturada, la hemoglobina remanente es excretada a nivel renal provocando hemoglobinuria, dando una coloración rosada de la orina. Además, cuando la haptoglobina y la hemopexina se saturan por la hemólisis masiva, se genera liberación del grupo hemo a circulación, el que estimularía la vía alterna del complemento al promover la hidrólisis de C3 en C3(H_2O), formado la fase fluida de la C3 convertasa directamente en el plasma, generando más depósitos de complemento sobre el eritrocito y amplificando la reacción hemolítica.

2.3. Antígenos eritrocitarios

Desde 1995, la International Society of Blood Transfusion (ISBT) se ha preocupado de establecer y actualizar la nomenclatura y clasificación de los sistemas sanguíneos humanos, basándose en el conocimiento de aspectos genéticos. Los antígenos forman parte de un sistema sanguíneo, cuando su biosíntesis está gobernada por solo un gen o un complejo de dos a más estrechamente ligados en genes homólogos, sin recombinación genética. Los 43 sistemas sanguíneos descritos hasta la fecha, se muestran en la tabla 24-3.

Tabla 24-3. Nomenclatura y genética de los grupos sanguíneos

N° ISBT	Nombre	Símbolo ISBT	N° Ags del Sistema	Nombre del gen cromosómica	Localización
001	ABO	ABO	4	*ABO*	9q34.2
002	MNS	MNS	50	*GYPA, GYPB (GYPE)*	4q31.21
003	P1PK	P1PK	3	*A4GALT*	22q13.2
004	Rh	RH	55	*RHD, RHCE*	1p36.11
005	Lutheran	LU	27	*BCAM*	19q13.2
006	Kell	KEL	36	*KEL*	7q33
007	Lewis	LE	6	*FUT3*	19p13.3
008	Duffy	FY	5	*ACKR1*	1q21-q22
009	Kidd	JK	3	*SLC14A1*	18q11-q12
010	Diego	DI	22	*SLC1A1*	17q21.31
011	Yt o Cartwright	YT	5	*ACHE*	7q22
012	Xg	XG	2	*XG, MIC2*	Xp22.32-Yp11.3
013	Scianna	SC	9	*ERMAP*	1p34.2
014	Dombrock	DO	10	*ART4*	12p13-p12
015	Colton	CO	4	*AQP1*	7p14
016	Landsteiner-Wiener	LW	3	*ICAM4*	19p13.2
017	Chido/Roger	CH/RG	9	*C4A, C4B*	6p21.3
018	Hh	H	1	*FUT1*	19q13.33
019	Kx	XK	1	*XK*	Xp21.1
020	Gerbich	GE	13	*GYPC*	2q14-q21
021	Cromer	CROM	20	*CD55*	1q32
022	Knops	KN	12	*CR1*	1q32.2
023	Indian	IN	6	*CD44*	11p13

024	Ok	OK	3	*BSG*	19p13.3
025	Raph	RAPH	1	*CD151*	11p15.5
026	John Milton Hagen	JMH	8	*SEMA7A*	15q22.3-q23
027	I	I	1	*GCNT2*	6p24.2
028	Globosido	GLOB	2	*B3GALNT1*	3q25
029	Gill	GIL	1	*AQP3*	9p13
030	Glicoproteína asociada al Rh	RHAG	4	*RHAG*	**6p12.3**
031	FORS	FORS	1	*GBGT1*	9q34.13-q34.3
032	JR	JR	1	*ABCG2*	4q22.1
033	LAN	LAN	1	*ABCB6*	2q36
034	Vel	VEL	1	*SMIM1*	1p36.32
035	CD59	CD59	1	*CD59*	11p13
036	Augustine	AUG	4	*SLC29A1*	6p21.1
037	Kanno	KANNO	1	*PRNP*	20p13
038	SID	SID	1	*B4GALNT2*	17q21.32
039	CTL2	CTL2	2	*SLC44A2*	19p13.2
040	PEL	PEL	1	*ABCC4*	13q32.1
041	MAM	MAM	1	*EMP3*	19q13.33
042	EMM	EMM	1	*PIGG*	4p16.3
043	ABCC1	ABCC1	1	*ABCC1*	16p13.11

Según lo publicado en la página de ISBT a junio de 2021, se han descrito aproximadamente 370 antígenos eritrocitarios, de los cuales 345 se agrupan en 43 sistemas sanguíneos los que a su vez están determinados por 48 genes distintos. Los antígenos restantes se ubican dentro de una de las 5 colecciones (series 200) o una de las 19 series de antígenos de alta o baja incidencia. Las colecciones, están formadas por antígenos que están relacionados genética, serológica o bioquímicamente, pero cuyas bases genéticas aún no se han descubierto. Las series, contienen antígenos que no encajan en los sistemas o colecciones, si tiene una incidencia en la población por sobre el 99% se ubican en la series 900 y si su frecuencia es menos al 1% conforman la serie 700.

Los antígenos eritrocitarios son de diversa naturaleza química y manifiestan distintas funciones, algunos de ellos además de expresarse en glóbulos rojos lo hacen en tejidos no eritroides, en la mayoría de los casos su rol biológico es desconocido.

Sistema ABO

Este sistema fue el primero en ser descubierto por el científico austriaco Karl Landsteiner en 1901, desde entonces es y sigue siendo el sistema sanguíneo más importante en medicina transfusional, puesto que, la transfusión incompatible a este nivel va a provocar una reacción hemolítica aguda del receptor, debido a la presencia de anticuerpos naturales en el suero de la persona, los que son fuertemente hemolíticos a la temperatura corporal.

Los antígenos de este sistema son de naturaleza hidrocarbonada y su síntesis a nivel eritrocitario resulta de la interacción del *gen ABO* con el *gen H (FUT1)* presentes en los cromosomas 9 y 19 respectivamente.

La síntesis se inicia con una cadena tetrasacárida llamada paraglobósido tipo 2, sobre el cual actúa le enzima Fucosil transferasa codificada por el *gen H* sintetizando de esta forma el antígeno H. El antígeno H es el sustrato sobre el cual actuarán las enzimas N-acetil Galactosaminil transferasa y Galactosil transferasa codificadas por el *gen A* y el *gen B*, respectivamente, generando de esta forma los denominadas antígenos A y B (figura 24-2).

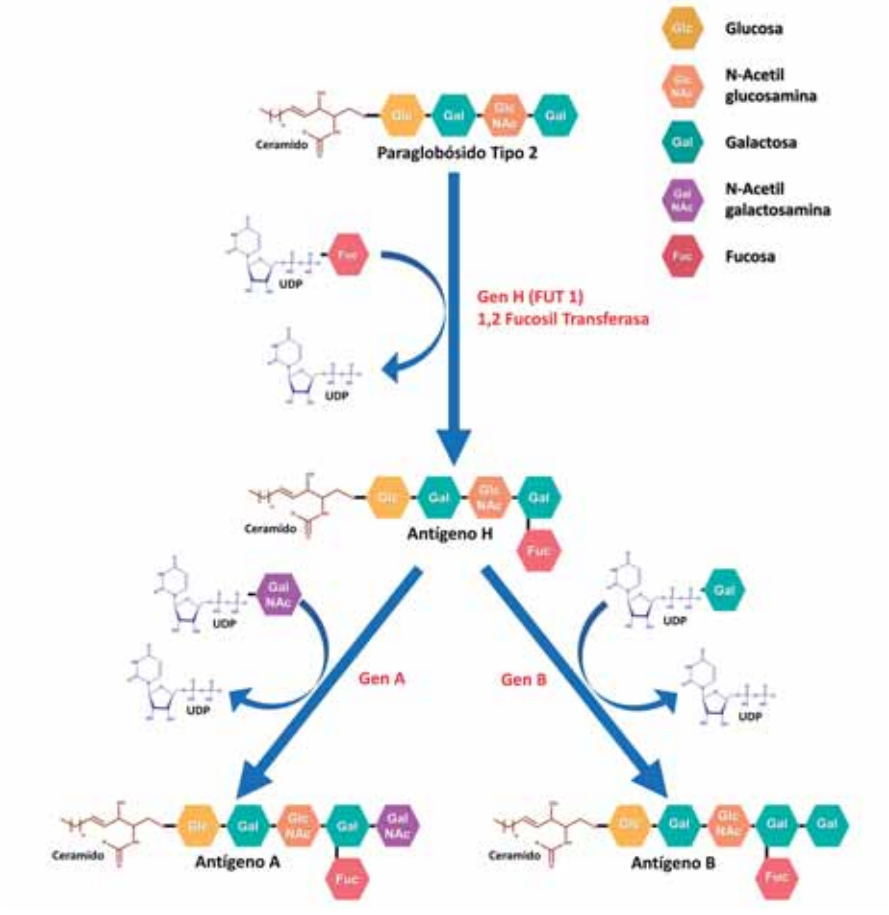


Figura 24-2. Biosíntesis de los antígenos ABO a nivel de glóbulos rojos.

En 1990 se dilucidaron las bases genéticas de los tres principales alelos del locus ABO. Los antígenos del sistema han sido identificados sobre glóbulos rojos, en secreciones y sobre la membrana de células epiteliales y endoteliales. Además, estructuras antigénicas similares han sido detectadas en diversos organismos tales como bacterias y plantas.

Sistema RH

El Sistema Rh es el segundo sistema en importancia clínica y el más complejo y polimórfico de los sistemas sanguíneos humanos, a este pertenecen aproximadamente 55 antígenos distintos, de los cuales los antígenos D, C, c, E y e son denominados "antígenos mayores" del sistema ya que por su inmunogenicidad tienen la mayor significancia clínica.

Los antígenos de ese sistema son de naturaleza proteica, son codificados por dos genes estrechamente unidos, que tienen un 94% de homología entre ellos y están ubicados en el cromosoma 1: el *gen RHD* codifica la proteína RhD que expresa el antígeno D y sus variantes y el *gen RHCE* codifica la proteína RhCE que expresa los antígenos C, c, E, e y sus variantes.

Ambas proteínas tienen gran similitud topográfica, sus pesos moleculares fluctúan de 30 a 34 kDa, constan de 417 aminoácidos y 12 residuos transmembrana. El polimorfismo de los principales antígenos radica en la presencia de aminoácidos específicos en los loops extracelulares de la proteína respectiva (figura 24-3).

La correcta expresión de los antígenos del sistema Rh requiere de la expresión de la glicoproteína asociada al Rh (RhAG), codificada por un gen ubicado en el cromosoma 6, el que tiene una homología de secuencias del 36% con los genes RHD y RHCE. La presencia de la glicoproteína RhAG es esencial para el ensamblaje de las proteínas Rh en la membrana eritrocitaria.

El antígeno D es el más importante del sistema. En la población blanca aproximadamente el 15% de los individuos son Rh negativo, por carecer de la proteína D en sus glóbulos rojos. En Chile, aproximadamente un 6% de individuos son Rh negativo, situación que es variable dependiendo del origen étnico de la población que se estudie, es así como en población mapuche se describe casi un 100% de Rh positivo.

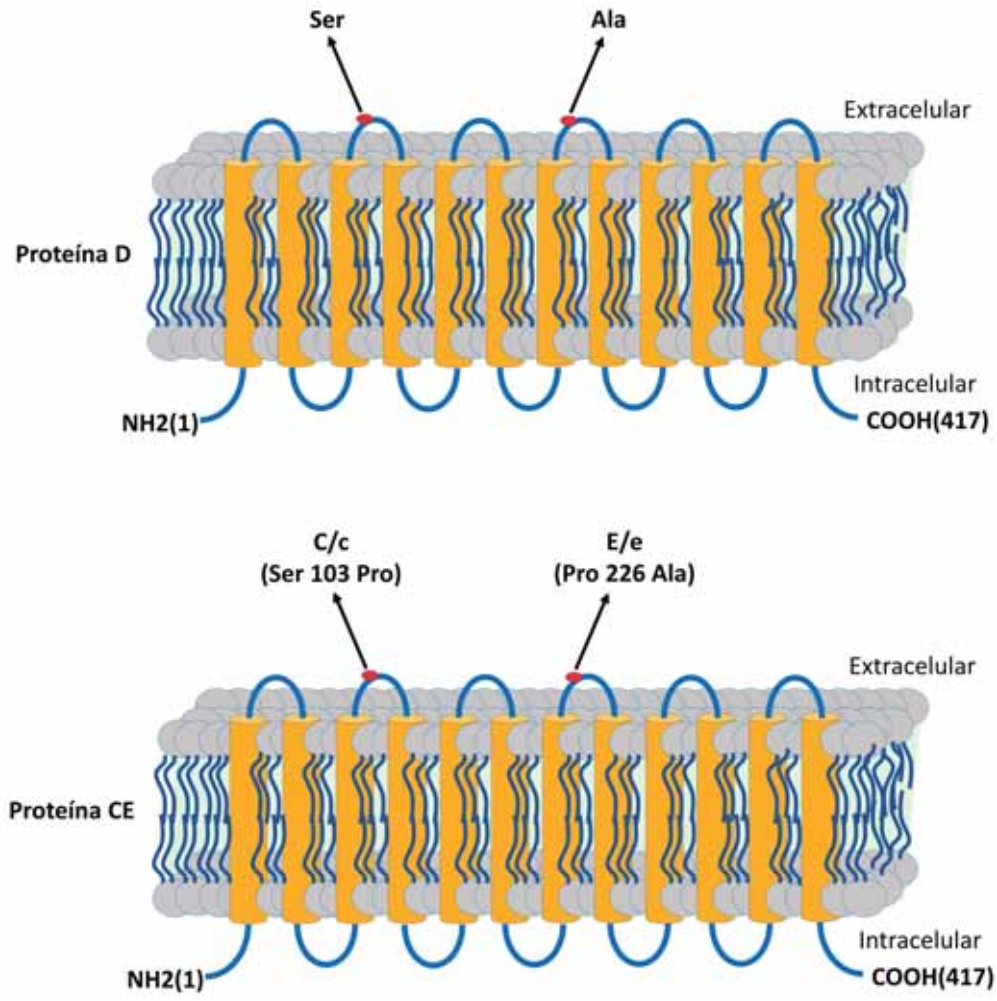


Figura 24-3. Estructura de las proteínas Rh en la membrana del glóbulo rojo, indicando los puntos de polimorfismos C/c y E/e de la proteína RhCE.

En general el 80% de las personas Rh negativo inmunocompetentes se aloinmunizan en respuesta al contacto con eritrocitos Rh positivo. Estos aloanticuerpos son usualmente del tipo IgG y pueden causar reacciones hemolíticas post-transfusionales de intensidad y severidad variable, y enfermedad hemolítica del recién nacido que puede llegar a ser muy severa y mortal.

Sistema Kell

El sistema sanguíneo Kell es considerado el tercer sistema de importancia clínica dada las propiedades inmunogénicas de sus antígenos, actualmente a este sistema pertenecen 36 antígenos, de los cuales 3 parejas de genes alélicos codifican los antígenos antitéticos más importantes del sistema, cada pareja tiene uno de sus antígenos de alta frecuencia, mientras que el otro es de muy baja frecuencia.

Los antígenos del sistema se ubican en la glicoproteína Kell, la que está constituida por 732 aminoácidos, de los cuales 47 corresponden al extremo amino terminal del anclaje citoplasmático, seguido de un residuo de transmembrana de 20 aminoácidos, para finalizar con un gran dominio extracelular de 665 aminoácidos, que tiene plegamientos por enlaces disulfuro.

Al igual que en el sistema Rh, la expresión normal de estos antígenos está asociada a la expresión de una proteína genéticamente independiente llamada proteína XK que es codificada en el brazo corto del cromosoma X y corresponde a una proteína integral de membrana, compuesta por 444 aminoácidos. La asociación de estas proteínas se realiza mediante un único enlace disulfuro entre la cisteína 72 de la glicoproteína Kell y la cisteína 347 de la proteína XK.

Los anticuerpos de este sistema son de origen inmune y de tipo IgG, responsables de generar reacciones hemolíticas pos-transfusionales o enfermedad hemolítica del recién nacido.

Sistema Duffy

El sistema Duffy está compuesto por 6 antígenos siendo los antígenos Fy^a y Fy^b los más importantes. La actividad Duffy reside en una glicoproteína que consta de 338 aminoácidos con 7 residuos transmembrana, el extremo amino terminal se ubica en la región extracelular y es glicosilado. Esta glicoproteína ha sido identificada como receptor para varias citoquinas debido a lo cual fue llamada DARC (Duffy antigen Receptor for chemokines).

Los anticuerpos Duffy son de baja frecuencia, en su mayoría son de isotipo IgG, subclase IgG_1. Los anticuerpos de este sistema a menudo se encuentran formando mezclas con otras especificidades y la mayoría de ellos muestra efecto de dosis.

Sistema P1PK

Los antígenos del sistema P1PK corresponden a glicoesfingolípidos anclados en la membrana de los glóbulos rojos, que son sintetizados por la acción de la enzima 4-α-galactosil- transferasa ($P1P^k$ sintetasa) sobre diversos sustratos. Si adiciona la Galactosa sobre el precursor denominado lactosilceramido se origina el antígeno P^k, si usa como sustrato el paraglobósido tipo 2 origina el antígenos P1. Este sistema está estrechamente relacionado con el sistema Globósido (028) que aporta el antígeno P, conocido como globósido que se genera por la acción de la β 1,3 N-acetil galactosaminil transferasa (globósido sintetasa) la cual cataliza la transferencia de un residuo de N-acetil galactosamina a la Galactosa terminal del antígeno P^k, originando así el Antígeno P, siendo este el glicoesfingolípido más común de la membrana eritrocitaria. La biosíntesis de estos 3 antígenos se representa en la figura 24-4.

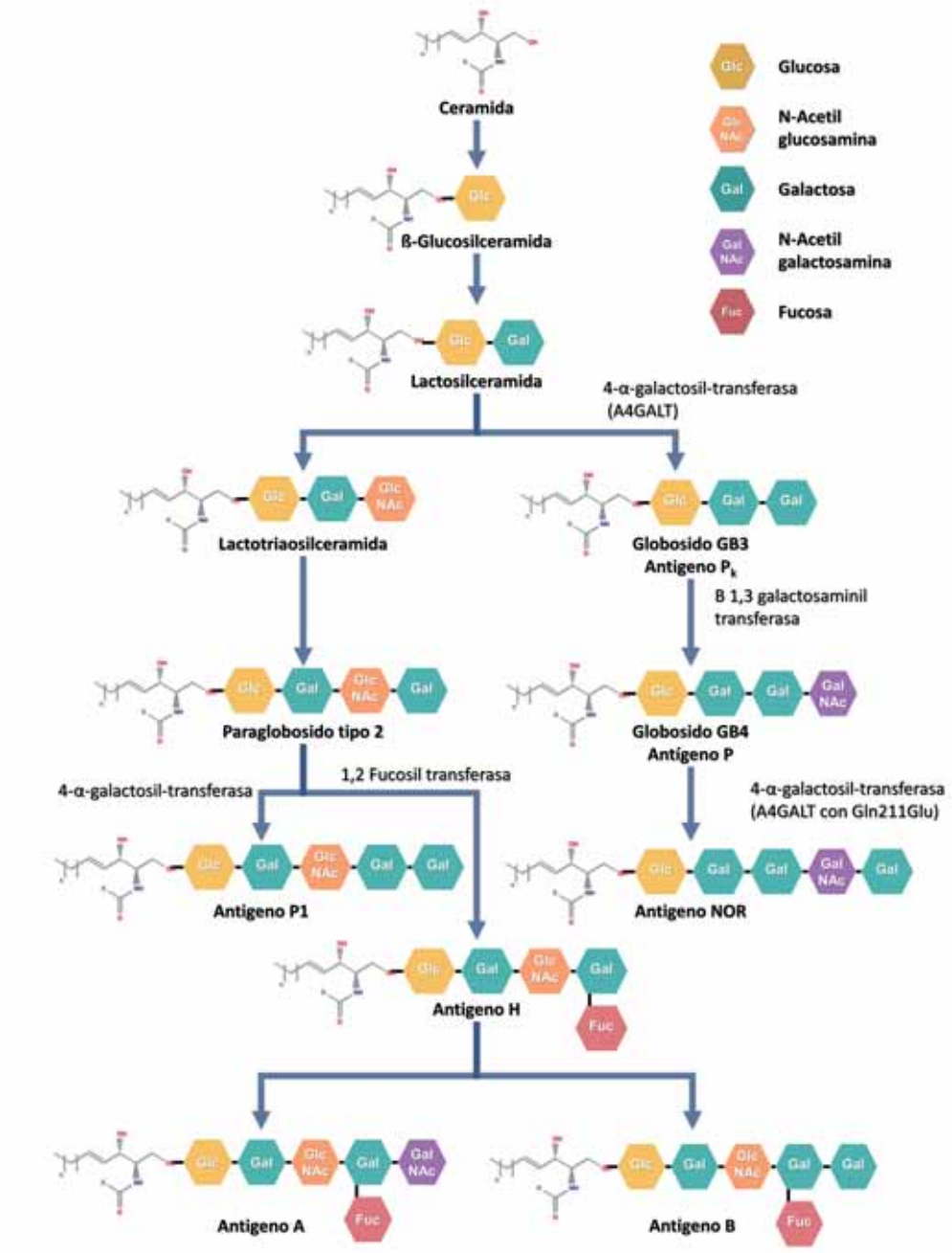


Figura 24-4. Biosíntesis de los antígenos del sistema P1PK y Globósido.

De la combinación de estos tres antígenos originan los fenotipos característicos que se muestran en la tabla 24-4.

Tabla 24-4. Fenotipos y potenciales anticuerpos de los sistemas P1PK y Globósido

Fenotipo	Frecuencia	Antígenos	Anticuerpos
P_1 (P1+)	20-90%	P_1, P^k, P	0
P_2 (P1-)	10-80%	P^k, P	Anti-P1
P_1k	Raro	P1, P^k	Anti P
P2k	Raro	P^K	Anti PP1
P	Raro	0	Anti- PP1P^k

En anticuerpo Anti-P1 es habitualmente de tipo IgM, que reacciona como aglutinina fría y solo ocasionalmente es activa a 37°C y es capaz de activar al complemento. El anticuerpo Anti-P se encuentra en el plasma de todos los individuos P negativos, también se ha asociado a casos de Hemoglobinuria paroxística fría (PCH), enfermedad que ocurre principalmente en niños que ha sufrido una infección viral. El suero de esos pacientes da positiva la prueba de Donath-Landsteiner.

Sistema I (027) y antígeno i (Colección 207002).

Los antígenos **i e I** son de naturaleza hidrocarbonada y corresponden a secuencias repetidas lineales o ramificadas, respectivamente, de N-Acetil Lactosamina, un disacárido compuesto por un residuo de Galactosa (Gal) unido, por enlace ß 1-4 a un residuo de N-Acetil glucosamina (GlcNAc). Estos glicanos están unidos a proteínas o glicoesfingolípidos de membrana extracelulares de los eritrocitos.

El gen *GCNT2* codifica para una N-acetil glucosaminil transferasa, enzima responsable de la conversión de las cadenas lineales con actividad "i", en cadenas ramificadas con actividad "I", proceso que ocurre en los primeros 18 meses de vida. El antígeno i, precursor de I, permanece con la nomenclatura 207002.

Los anticuerpos que reconocen estos antígenos son crioaglutininas que pueden ser detectadas en muchos de los sueros normales como una autoanticuerpo frío de bajo título no asociado a patologías. El anticuerpo Anti-I adquieren importancia clínica cuando se incrementan los títulos (>500) y manifiesta amplitud térmica por sobre los 30°C, en cuyo caso es responsable de la Enfermedad de las Aglutininas Frías.

2.4. Anemias hemolíticas aloinmunes

Los cuadros clínicos asociados a este tipo de anemia son la Enfermedad Hemolítica del Feto y el Recién Nacido y las Reacción Hemolítica Transfusional. Para que ocurra uno de estos cuadros, se requiere que la persona esté previamente aloinmunizada. La aloinmunización corresponde al proceso mediante el cual un individuo genera anticuerpos posteriores a la exposición a antígenos extraños presentes en otro individuo de la misma especie, esta exposición puede ocurrir

por embarazos, transfusión de sangre alogénica, trasplante de stem-cell alogénicos o accidente con agujas contaminadas con sangre. La aloinmunización va a depender tanto de la respuesta inmune de la persona como de la inmunogenicidad intrínseca de los antígenos involucrados.

2.4.1. Enfermedad hemolítica del feto y recién nacido

La enfermedad hemolítica del feto y el recién nacido (*de la sigla en inglés HDFN*) es una afección en la que las células eritroides fetales y neonatales son destruidas por aloanticuerpos IgG, provenientes de la madre que se transportan a través de la placenta. Estos aloanticuerpos están dirigidos contra antígenos presentes en los eritrocitos del gestado, que han sido heredados del padre. Solamente los anticuerpos clase IgG son transportados activamente a través de la placenta y por lo tanto capacitados para cruzarla y sensibilizar los glóbulos rojos fetales que posteriormente son retirados por el SFM del feto, especialmente en el bazo.

En las embarazadas, el paso transplacentario de sangre fetal a la madre con glóbulos rojos incompatibles puede estimular el sistema inmune materno, produciendo la aloinmunización. La reacción entre los aloanticuerpos maternos y los antígenos eritrocitarios del feto se traduce en hemólisis o puede ocurrir supresión de la eritropoyesis, lo que da como resultado la enfermedad hemolítica del feto y el recién nacido (*HDFN*).

La *HDFN* se desencadenada por más de 50 antígenos eritrocitarios diferentes, pero los casos más graves involucran el antígeno D (RhD), que causa la enfermedad hemolítica mediada por sistema Rh. La incompatibilidad ABO, originada en madres del grupo O, con hijos que expresan los antígenos A ó B, es la causa más común de enfermedad hemolítica, presentándose anemia leve en los recién nacidos, que rara vez requiere intervención. Los casos de *HDFN* clínicamente significativos se deben principalmente a aloanticuerpos contra antígenos de los sistemas Rh, Kell, Duffy, Kidd y MNS. Aunque los aloanticuerpos contra el antígeno D del sistema Rh sigue siendo la causa principal de *HDFN* grave, pero, dada la inmunoprofilaxis utilizada ampliamente para prevenir la aloinmunización al antígeno D, esta ha disminuido y está emergiendo como una de las principales causas de *HDFN*, la ocasionada por anticuerpos contra los antígenos del sistema Kell.

Los efectos de la incompatibilidad materno fetal van desde anemia e hidropesía en el feto hasta hiperbilirrubinemia y kernicterus en el recién nacido. La fisiopatología que se desencadene depende en parte de las características del anticuerpo materno y el antígeno eritrocitario. Fetos afectados por anti-D materno pueden causar hidropesía y muerte fetales intrauterina o provocar anemia y una hiperbilirrubinemia tan grave al nacimiento, que desarrollan kernicterus. Sin embargo, los fetos afectados por anticuerpos maternos anti-Kell tienen más probabilidades de tener anemia y reticulocitopenia, pero rara vez hiperbilirrubinemia significativa.

El cuadro anémico provoca en el hijo una estimulación a nivel de médula ósea para acelerar la tasa de producción de eritrocitos, que induce la liberación de células inmaduras (eritroblastos) a circulación periférica. Cuando la médula no es capaz de suplir la demanda de glóbulos rojos, la eritropoyesis ocurre a nivel hepático y esplénico provocando hepatoesplenomegalia que induce hipertensión portal y daño hepatocelular. La anemia severa junto con la hipoproteinemia causada por una disminución de producción hepática de proteínas plasmáticas induce una falla cardíaca con edema generalizado, efusión y ascitis, condición conocida como *hidrops fetalis*.

La hemólisis libera hemoglobina que se metaboliza a bilirrubina. La forma no conjugada de esta molécula es transportada a través de la placenta para ser conjugada en el hígado materno para luego ser excretada por la madre, así los niveles de bilirrubina en la circulación fetal y en el líquido amniótico, aunque estén aumentados no causan complicaciones al feto. Por el contrario, después del nacimiento la bilirrubina no conjugada se acumula en la circulación del recién nacido ya que la inmadurez hepática hace que el proceso de conjugación sea poco eficiente. La bilirrubina no conjugada puede alcanzar niveles tóxicos (> 18 mg/dL) para el recién nacido, ya que atraviesa la barrera hematoencefálica y se infiltra en el tejido cerebral produciendo una encefalopatía bilirrubínica irreversible, cuadro conocido como *kernicterus*.

Para explicar la reticulocitopenia marcada que se presenta en la *HDFN* ocasionada por anticuerpos del sistema Kell, se ha planteado la hipótesis de que la expresión del antígeno Kell en los precursores tempranos de glóbulos rojos fetales, juega un papel importante con supresión directa de la eritropoyesis. Por otra parte la falta de hiperbilirrubinemia observada en fetos afectados por anticuerpos anti-Kell, se debe en parte, a aclaramiento inmunomediado de precursores de glóbulos rojos muy tempranos que no contienen hemoglobina.

Diagnóstico y evaluación prenatal

Detección, titulación y estudio de anticuerpos maternos. Todas las mujeres embarazadas deben hacerse la detección de aloanticuerpos en el suero. Esta se realiza mediante la prueba de antiglobulina humana indirecta (PAI). Si se detecta en el suero de una embarazada la presencia de un aloanticuerpo, se debe identificar para conocer su especificidad y luego titular de modo de tener un valor basal de la cantidad relativa de anticuerpo presente. La titulación de anticuerpos se realiza para evaluar si los glóbulos rojos del feto actúan como un estímulo inmunizante. Además, los títulos de aloanticuerpos maternos se utilizan para predecir el riesgo del feto. Una mejor correlación para evaluar gravedad, en los casos de anticuerpos anti-D, es conocer subtipos de IgG. La anemia fetal se correlaciona positivamente con la cantidad de IgG1 anti-D y negativamente con la cantidad de IgG3 anti-D unida a los glóbulos rojos fetales. Nuevas técnicas para predecir anemias fetales graves son los ensayos biológicos de citotoxicidad celular dependientes de anticuerpos (*in vitro*), las cuales predicen la actividad de los aloanticuerpos; y la asociación entre patrones de glicosilación de anti-

cuerpos en la unión de FcγR. Si los aloanticuerpos maternos anti-D presentan menor grado de fucosilación (medida por espectroscopia de masas), se asocia con una anemia fetal más grave.

Espectrofotometría de líquido amniótico. Debe evaluarse cuidadosamente la necesidad de hacer espectrofotometría de líquido amniótico mediante amniocentesis, por ser un método invasivo no exento de riesgos. Este procedimiento se basa en que la concentración de bilirrubina en el líquido amniótico se correlaciona con el grado de anemia fetal. Este análisis consiste en medir la densidad óptica del líquido amniótico entre 350 y 700 nm, a los 450 nm se produce un "peak" de absorción dado por la bilirrubina presente, la diferencia que se produce con respecto a la linealidad de absorbancias se anota como Δ DO 450 nm, este valor se lleva al gráfico de Liley considerando la edad gestacional. La densidad óptica del líquido amniótico es más alta en el segundo trimestre y disminuye, gradualmente, hasta el nacimiento. En el gráfico se distinguen 3 zonas, que orientan el manejo obstétrico de las embarazadas; valores en zona III indican hemólisis severa con riesgo de vida por lo que se requiere de una intervención urgente; en la zona II es sugerente de una enfermedad moderada que podría requerir intervención; la zona I indica enfermedad ausente o leve que no requiere intervención, sino control seriado.

Ultrasonido. Para determinar el estado clínico del feto en la *HDFN*, debe ser monitoreado por ultrasonografía para buscar evidencia de ascitis (hidropesía) o anemia y para controlar la frecuencia cardíaca. La evaluación de la anemia fetal se lleva a cabo de forma no invasiva mediante medición ecográfica del flujo sanguíneo fetal a través de los grandes vasos cerebrales, generalmente la arteria cerebral media. La velocidad del flujo sanguíneo indica el grado de anemia.

Cordocentesis. El desarrollo del ultrasonido permitió, además, efectuar procedimientos para la obtención de sangre de cordón, en la que se pueden medir los parámetros bioquímicos y hematológicos estándares, siendo esta la forma más segura de determinar el estado de avance de la *HDFN* en ausencia de hidrops. Este procedimiento se puede realizar entre las 20 y 21 semanas de gestación, pero en situaciones extremas se puede hacer, incluso, con 18 semanas.

Determinación del fenotipo Rh del feto. El clonamiento del cDNA de los genes D y CE, han proporcionado un medio para determinar la presencia o ausencia del gen D en el feto a partir del DNA fetal obtenido desde las vellosidades coriónicas o por amiocentesis, pero existe riesgo de pérdida fetal con el procedimiento, por lo que se han desarrollado nuevas técnicas que aíslan el ADN fetal de una muestra de sangre periférica materna para genotipificación.

Diagnóstico y evaluación postnatal

Análisis de sangre de cordón. En sangre de cordón se pueden realizar los análisis bioquímicos, hematológicos e inmunohematológicos. Desde el punto de vista hematológico se podrá evaluar la concentración de hemoglobina, reticulo-

citosis, presencia de eritroblastos; morfología de las células rojas que se observarán con macrocitosis y policromatofilia como consecuencia del aumento de la eritropoyesis. Con la monitorización de niveles de hemoglobina y bilirrubina se puede determinar si es necesaria fototerapia, transfusión simple o exanguinotransfusión. Como exámenes inmunohematológicos se observa la prueba de antiglobulina humana directa (PAD) positiva. En la *HDFN* por incompatibilidad ABO, la PAD puede ser negativa o débilmente reactiva; Desde el punto de vista bioquímico se encuentra hiperbilirrubinemia en un grado variable dependiendo de la severidad de la hemólisis, la que podría tender a un incremento significativo en las 24 a 72 horas siguientes al nacimiento.

Tratamiento prenatal

Reducción de la tasa de anticuerpos maternos. Como terapias maternas complementarias, durante embarazo, para disminuir la gravedad de la anemia fetal se utiliza inmunoglobulina intravenosa (IgIV) y plasmaféresis, aunque la evidencia para respaldar la eficacia de estas terapias es limitada. Si el feto está en un nivel de riesgo moderado o la edad gestacional no permite otro tipo de procedimiento, se puede recurrir a la plasmaféresis, que puede reducir la tasa de anticuerpos hasta en un 75%. El plasma removido se reemplaza con albúmina e IgIV, como una forma de minimizar el efecto rebote que habitualmente hace aumentar dramáticamente el nivel de anticuerpos maternos post plasmaféresis.

Transfusión intrauterina. Si la severidad de la enfermedad indica alto riesgo y no es posible interrumpir el embarazo por la edad gestacional, se puede realizar una transfusión intrauterina (TIU) a través del cordón umbilical. Para estas transfusiones de glóbulos rojos se seleccionan grupo O Rh(D) negativo, que carezcan del antígeno que es reconocido por el anticuerpo materno, con una prueba cruzada negativa utilizando el suero materno. Además, deben ser leucocitos reducidos, irradiados y en lo posible con serología negativa para citomegalovirus y concentrado para garantizar la máxima entrega y asegurar que el hematocrito del feto sea ≥30%.

Tratamiento postnatal

Después del parto, los bebés son monitoreados para detectar niveles de hemoglobina y bilirrubina. Los bebés afectados por *HDFN* tienen un rápido aumento de bilirrubina, que dependiendo de sus niveles se determinará si es necesaria fototerapia o exanguinotransfusión.

La fototerapia se utiliza si la hiperbilirrubinemia es leve. Este procedimiento consiste en exponer el neonato a una fuente de luz fluorescente (luz azul) que es capaz de reducir el nivel de bilirrubina, ya que es oxidada a biliverdina, metabolito no tóxico e hidrosoluble que es excretado por la bilis y la orina.

Si el recién nacido sufre hidrops o los niveles de hemoglobina son inferiores a 12 g/dL, o el aumento de la bilirrubina es superior a 5,0 mg/dL/día, se está en presencia

de una *HDFN* severa, debiendo realizarse una exanguinotransfusión, con el objetivo de remover la bilirrubina libre y los glóbulos rojos sensibilizados, por otros que tengan las mismas características que los empleados en una transfusión intrauterina. Aunque la exanguinotransfusión es una terapia crítica para la prevención de kernicterus, tiene complicaciones y no corrige la anemia de manera significativa, por lo que es posible que aún se necesiten transfusiones complementarias.

Prevención

La prevención de la aloinmunización materna se divide en 3 diferentes categorías: primaria, secundaria y terciaria.

a) Prevención primaria; se centra en prevenir la posibilidad de aloinmunización materna mediante una exposición reducida a antígenos eritrocitarios extraños. Para esto se utilizan protocolos de suministro de glóbulos rojos en emergencia a mujeres en edad fértil del grupo O RhD negativo.
b) Prevención secundaria: La administración de RhIg dirigida a eliminar o enmascarar los glóbulos rojos RhD-positivo fetales que se encuentran en la circulación materna después del parto. El objetivo es prevenir que células Rh positivas estimulen una respuesta inmune materna, evitando así la formación de anticuerpos que pudieran ocasionar problemas en embarazos futuros. El producto ha tenido un enorme impacto en la prevalencia de *HDFN* debido a anti-D, disminuyendo la incidencia del 16% al 0,1%.
c) Prevención terciaria: Se refiere al uso de glóbulos rojos con fenotipo extendido compatible para transfusiones intrauterinas. En este escenario, la embarazada ya está aloinmunizada y tiene un feto que está afectado. El objetivo de esta prevención es evitar la ampliación de las especificidades de los aloanticuerpos maternos que pueda afectar embarazos futuros.

2.4.2. Reacción hemolítica transfusional

En una transfusión sanguínea, la composición antigénica de los glóbulos rojos del donante siempre difiere con la del receptor, lo que potencialmente generará una aloinmunización de este, tal como se mencionada en la introducción a este tema. Se ha reportado una prevalencia de aloanticuerpos anti-eritrocitarios de 4% en donantes de sangre; de 2 a 9 % en pacientes poli transfundidos y de 2,9 a 37% en pacientes con talasemia.

Una reacción hemolítica transfusional ocurre cuando hay incompatibilidad inmunológica entre el donante y el receptor. Las reacciones hemolíticas transfusionales se clasifican en agudas o tardías, dependiendo del tiempo de aparición de los síntomas y signos. Las reacciones agudas ocurren dentro de las primeras 24 horas de iniciada la transfusión y las tardías después de las 24 horas.

a) Reacción hemolítica transfusional aguda

Este tipo de reacciones ocurre cuando los anticuerpos están presentes en el plasma del paciente y son activadores del complemento. La causa más típica

de este tipo de reacción es la incompatibilidad ABO, dado que los anticuerpos anti-A y anti-B están presente en el plasma de todas las personas en forma recíproca a la presencia de los antígenos respectivos, son de clase IgM, capaces de fijar y activar completamente el sistema del complemento.

La prevalencia de las reacciones hemolíticas agudas se ha estimado en un rango aproximado de 1 en 70.000 a 1 en 200.000 transfusiones. La incompatibilidad ABO ocurre por errores administrativos tales como errores en la identificación o en el etiquetado de la muestra de sangre del receptor. En Estados Unidos se reportan de 1 a 4 muertes anuales por reacciones hemolíticas transfusionales agudas. Anticuerpos dirigidos contra otros antígenos, tales como, Kell, Jk^a y Fy^a, también pueden causar este tipo de reacciones.

Los mecanismos fisiopatológicos asociados con estas reacciones corresponden a lo descrito previamente para la hemólisis intravascular. Se inicia con la formación de un complejo inmune donde el anticuerpo preexistente involucrado es de clase IgM, capaz de activar el sistema del complemento. La activación del complemento llega hasta la formación del MAC que induce múltiple poros en la membrana eritroctitaria, provocando la liberación de hemoglobina y del grupo hemo al plasma, el exceso de estos compuestos satura la capacidad de transporte de la haptoglobina y de la hemopexina, respectivamente, generando su eliminación por la orina. El grupo hemo libre induce vasoconstricción renal producto de la disminución de los niveles de óxido nítrico por estimulación del sistema depurador, necrosis tubular aguda y fallo renal.

Producto de la activación del complemento también se liberan los fragmentos C3a y C5a que actúan como potentes anafilotoxinas que inducen a mastocitos a liberar histamina y serotonina. Los subproductos de la hemólisis, como el estroma de los glóbulos rojos, monocitos y leucocitos activados, enzimas, y anafilatoxinas, median la liberación de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias (factor de necrosis tumoral α e interleucina-8). Además, se genera la activación del sistema de bradicinina y calicreína y de la coagulación lo que genera el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica caracterizado por aumento de la permeabilidad capilar, vasodilatación, hipotensión y fiebre, así como coagulación intravascular diseminada (CID) (ver capítulo 36). En casos extremos, el cuadro progresa a shock, con falla orgánica múltiple y muerte.

Sintomatología y diagnóstico. Los signos y síntomas característicos de esta reacción son: fiebre, dolor lumbar, enrojecimiento facial, dolor en el recorrido de la vena puncionada, disnea y taquicardia. En pacientes anestesiados los signos principales son la hipotensión, la hemoglobinuria y el sangramiento en napa de las heridas quirúrgicas producto de la CID. Para el diagnóstico es necesario una muestra de sangre post-transfusional para realizar, en primera instancia, una inspección visual de la coloración del plasma y su comparación entre esta muestra y la pre-transfusional, la aparición de un plasma evidentemente hemolisado en la muestra post-transfusional será un signo claro de hemólisis intravascular. Además se debe hacer una prueba de antiglobulina directa (PAD), que al ser

positiva será patognomónico de la hemólisis inmune, no obstante, si la tasa de hemólisis es muy alta la PAD podría ser negativa.

El manejo va a depender de la severidad de la reacción, pero en todos los casos frente a una reacción, la transfusión debe ser detenida inmediatamente, pues la severidad de la reacción se correlaciona con el volumen de glóbulos rojos incompatibles transfundidos.

La mayoría de estas reacciones son evitables ya que la causa principal se debe a errores administrativos, por lo que el seguimiento riguroso de los procedimientos operativos estándar disponibles para el despacho e instalación de una transfusión evitará la ocurrencia de esta reacción.

b) Reacción transfusional hemolítica tardía

Las reacciones transfusionales hemolíticas tardías, por lo general son más leves que las agudas ya que la hemólisis es de predominio extravascular. La incidencia de este tipo de reacciones se estima en un rango de 1 en 500 a 1 en 10.000 transfusiones, sin embargo, este riesgo se incrementa de un 1 a un 20% en pacientes con enfermedades hematológicas como anemia de células falciformes, talasemia, entre otras.

Esta reacción se producen por una respuesta inmune secundaria (anamnéstica) en receptores que están previamente aloinmunizados ya sea por embarazos o transfusiones y que tienen títulos bajos anticuerpos habitualmente de isotipo IgG, no detectados en las pruebas pre-transfusionales. Producto del nuevo estímulo inducido por la transfusión, los títulos del anticuerpo se incrementan rápidamente, así los glóbulos rojos transfundidos se sensibilizan con anticuerpos IgG u opsonizados con fragmentos de C3 activado (C3d) y posteriormente secuestrados por los macrófagos del SFM hepático o esplénico, lo que corresponde a una hemólisis extravascular. La especificidad de los anticuerpos involucrados en este tipo de reacción están dirigidos contra antígenos de los sistemas Kell, Rh (D, E y c), Duffy y Kidd.

Sintomatología y diagnóstico: Las manifestaciones clínicas de esta reacción, se inician entre 2 a 14 días de realizada la transfusión de sangre incompatible e incluyen: fiebre, anemia e ictericia debido a la destrucción extravascular de lo eritrocitos, seguida de la degradación de la hemoglobina y liberación de bilirrubina al plasma. Para el diagnóstico es necesario una muestra de sangre post-transfusional para medir el nivel de hemoglobina, bilirrubina y realizar una prueba de antiglobulina directa (PAD), que al ser positiva será patognomónico de la hemolisis inmune.

La prevención de esta reacción considera revisar los registros de aloinmunización del paciente especialmente en quienes tienen historial transfusional, de trasplantes y de embarazos. Paralelamente, cada vez parece más factible avanzar hacia la genotipificación de antígenos eritrocitarios en donantes de sangre

como una forma segura y eficiente de contar con unidades negativas para antígenos específicos.

2.5. Anemias hemolíticas autoinmunes

Las Anemias hemolíticas autoimunes (AHAI) se producen por alteraciones en los mecanismos reguladores normales de la respuesta inmune, con la consecuente formación de anticuerpos patológicos que reaccionan con antígenos eritrocitarios propios, induciendo su destrucción. En situaciones normales, los linfocitos T supresores inducen tolerancia a los antígenos propios al inhibir la actividad de las células B, por lo que la pérdida o alteración de esta función puede resultar en la producción de autoanticuerpos. La inmunopatología de las enfermedades autoinmunes se desencadena por la presencia de anticuerpos auto-reactivos o por la activación de células T que secretan citoquinas tipo Th1 que conducen a la activación de fagocitos. Existen evidencias de que agentes microbianos y drogas lo alteran, así como asociación con desórdenes relacionados con fallas en la inmunorregulación, como son Lupus eritromatoso sistémico (LES) y desórdenes linfoproliferativos.

La presencia de autoanticuerpos es importante por dos razones: (a) ellos pueden causar destrucción *in vivo* de glóbulos rojos, generando el cuadro anémico y (b) cuando los eritrocitos están cubiertos por autoanticuerpos y estos también están libres en el suero y son reactivos con células de donantes al azar, puede ser más difícil la determinación de grupo sanguíneo ABO, la detección e identificación de aloanticuerpos y las pruebas de compatibilidad pretransfusionales. Los autoanticuerpos pueden ser inocuos o nocivos dependiendo de la temperatura máxima a la que son activos.

Este tipo de anemia representa el 5% de todas las anemias, con una incidencia que varía entre 0,4 y 2,0 por cada 100.000 habitantes, siendo más frecuentes en pacientes de sexo femenino. Las causas por la cuales se puede presentar son diversas y comprenden desde estados fisiológicos como el embarazo (incidencia 1/ 50.000) a usos de fármacos, sin embargo, la gran mayoría de los casos se presentan secundarias a alguna patología.

El reconocimiento de las formas más comunes de AHAI se logró gracias al desarrollo de la prueba de Coombs directa e indirecta en el año 1945, hoy en día denominados prueba de antiglobulina directa (PAD) y prueba de antiglobulina indirecta (PAI). Fundamentalmente, la PAD se utiliza para determinar si los glóbulos rojos tienen inmunoglobulina G unida a la superficie (IgG) y/o complemento, usando en primer lugar suero antiglobulina poliespecífico que contiene anticuerpos anti-IgG y anti-complemento. Si la reacción es positiva, los hematíes se enfrentan con suero antiglobulina mono específico para detectar individualmente IgG y complemento. Para la realización de esta prueba se han descrito diferentes técnicas, como hemaglutinación en fase líquida (tubo), aglutinación en columna (gel test), citometría de flujo y técnicas moleculares como inmunoblotting.

En las AHAI los anticuerpos que se producen van dirigidos generalmente contra sistemas de antígenos eritrocitarios y reaccionan a diferentes temperaturas, permitiendo clasificarlas de acuerdo al isotipo del autoanticuerpo formado en: a) anemia hemolítica por anticuerpos calientes, cuando es una inmunoglobulina G (IgG) b) por anticuerpos fríos, si la inmunoglobulina es M (IgM) c) anemias por anticuerpos bifásicos, capaces de unirse al eritrocito a temperaturas bajas (4°C) y provocar la lisis del hematíe al retornar la sangre de la circulación capilar a la circulación venosa (37°C), d) de tipo mixtas, en donde se pueden presentar tanto anticuerpos calientes como fríos como responsables del cuadro hemolítico y e) el grupo de AHAI causada por el uso de algunas drogas.

Los eritrocitos recubiertos con autoanticuerpos son en primer lugar secuestrados en el bazo, ya que son detectados por receptores específicos presentes en los macrófagos, esta interacción puede inducir fagocitosis total o parcial de los eritrocitos. Cuando se produce la remoción de parte de la membrana celular y el eritrocito se libera nuevamente a circulación, situación que es muy frecuente, la célula queda con una menor proporción de membrana, lo que trae como consecuencia la aparición de esferocitos, caracterizados por su rigidez, baja sobrevida y aumento de fragilidad frente a cambios osmóticos.

2.5.1. AHAI por anticuerpos calientes

La AHAI por anticuerpos calientes corresponden al 70-80% de las AHAI. Es más frecuente en mujeres, entre la tercera y cuarta década de vida. Puede ser idiopática en el 50% de los casos, o secundaria a enfermedades: síndromes linfoproliferativos, lupus eritematoso sistémico, leucemia linfocítica crónica, entre otros.

Se produce cuando el sistema inmune del paciente produce anticuerpos anti-eritrocitarios que reaccionan más eficientemente en el laboratorio a temperaturas de 37°C. La subclase de IgG formada que predomina es IgG1 y en menor proporción IgG3, siendo las dos subclases de inmunoglobulinas G las que fijan con mayor avidez complemento; IgG3 resulta ser más eficiente, respecto a IgG1. Pueden además estar acompañados de IgA e IgM, rara vez estos últimos se presentan solos, pudiendo ser fijadores parciales o no fijadores de complemento, por lo que inducen hemólisis extravascular, como consecuencia de lo cual se observa hiperbilirrubinemia.

El curso de la enfermedad puede ser agudo o crónico, con remisiones y exacerbaciones. Los hallazgos clínicos incluyen, debilitamiento progresivo, episodios febriles, hemoglobinuria, ictericia moderada, hepatoesplenomegalia y linfoadenopatías.

Fisiopatología: la sensibilización del eritrocito ocurre a 37°C, pudiendo provocar hemólisis extravascular por fagocitosis en: células reticuloendoteliales en sinusoides del bazo, cuando la cantidad de IgG unida al eritrocito es baja, o fagocitosis por los macrófagos a nivel de hígado, si la cantidad de IgG recubriendo los eritrocitos es alta y se ha producido activación del complemento hasta C3b, lo que

coadyuva a la opsonización. También los eritrocitos opzonizados con IgG pueden unirse al receptor Fc de los macrófagos, provocando daño en la membrana celular y dando origen a los microesferocitos. La severidad de la enfermedad autoinmune se ha relacionado con ciertas propiedades de los autoanticuerpos, como título en el suero, avidez por los eritrocitos y capacidad de fijar el complemento, así como número y distribución de los antígenos en los glóbulos rojos.

La AHAI caliente cuando se presenta en forma simultánea o secuencial con trombocitopenia se conoce como Síndrome de Evans. Este diagnóstico, particularmente en adultos jóvenes y pacientes pediátricos, debe ir acompañado mediante un estudio inmunológico básico que incluye la detección de síndrome linfoproliferativo autoinmune (de la sigla en inglés ALPS).
Diagnóstico: Las AHAI por anticuerpos calientes, en la práctica clínica, suele ser de diagnóstico y tratamiento problemático y dependen de la adecuada comprensión de la fisiopatología y las pruebas de laboratorio realizadas, que incluyen la combinación de signos de hemólisis en los glóbulos rojos junto a la detección de autoanticuerpos y/o complemento.

Hallazgos de laboratorio

Hematológicos. El nivel de hemoglobina se encuentra disminuido en un grado variable de acuerdo con la intensidad de la anemia. Se presenta reticulocitosis, lo que refleja un incremento de la destrucción de los glóbulos rojos. Es posible en ocasiones encontrar cuadros con reticulocitopenia, producto de la destrucción de las células al contar estas con determinantes antigénicos desarrollados, situación que se asocia con una alta mortalidad. En frotis sanguíneo se encuentran esferocitosis, policromatofilia y macrocitosis.

Bioquímicos. Se observan niveles elevados de lactato deshidrogenasa (LDH), hiperbilirrubinemia, indirecta, disminución de haptoglobina, hemoglobinuria y urobilinógenos urinarios.

Inmunohematológicos. El 90% de los casos presenta la PAD positiva, confirmando la presencia de glóbulos rojos sensibilizados con IgG con o sin fracciones del complemento, y un eluado reactivo con anticuerpos de clase IgG. Sin embargo, si esta prueba es negativa, la presencia de esferocitos en la sangre periférica puede apoyar el diagnóstico. En el caso de que la PAD resulte positiva al utilizar un reactivo poliespecífico, se debe realizar una PAD diferencial, con la utilización de reactivos monoespecíficos (anti-IgG, anti-Ig A, anti C3c, anti C3d, anti C4b), con el fin de discriminar el tipo de inmunoglobulinas y/o la fracción de complemento que recubre los glóbulos rojos. En el 10% de las AHAI de tipo caliente la PAD es negativa. Las razones principales que en estos casos explican la ausencia de una prueba positiva son: sensibilización IgG por debajo del umbral de detección por el reactivo antiglobulina comercial ó IgG de baja afinidad, eliminada por lavados preparatorios. Otra causa de PAD falso negativo es la presencia de autoanticuerpos IgA que se puede detectar solo si el PAD se realiza con un suero anti-IgA. La opsonización de los glóbulos rojos con anticuerpos

o complemento puede ser confirmada utilizando citometría de flujo (capaz de detectar alrededor de 30 a 40 moléculas de anticuerpos por glóbulo rojo). El uso de immunoblotting para detectar pequeñas cantidades de inmunoglobulina adherida a los eritrocitos ha sido demostrado; sin embargo, se requieren estudios adicionales para validar el uso de esta técnica.

Generalmente el autoanticuerpo caliente no interfiere con la determinación del grupo ABO y Rh, pero puede interferir en los estudios de reactividad del suero. Aproximadamente en el 80% de los casos, el autoanticuerpo no solamente se encuentra unido a los eritrocitos, sino que también aparece libre en el suero, reaccionando con células de donantes o en una PAI positiva, cuando hay una hemólisis activa.

La especificidad de los autoanticuerpos calientes es variable y la mayoría de ellos reconocen antígenos de alta incidencia. Unos pocos reaccionan específicamente con antígenos del sistema Rh (especificidad relativa), pero lo más frecuente es encontrar que reaccionan bien con todos los eritrocitos, salvo con células Rh nulo, por lo que presentan especificidad amplia para antígenos del sistema Rh. Ocasionalmente se han descrito autoanticuerpos asociados a otros sistemas sanguíneos como al antígeno Wr^b del sistema Diego.

Tratamiento

Los tratamientos actuales buscan detener o atenuar el proceso hemolítico a través de la inhibición de la producción de autoanticuerpos y/o inhibición de la destrucción de glóbulos rojos.

Tratamiento de primera línea. *Corticoides.* El más comúnmente usado es la prednisona. Con este tratamiento se puede alcanzar una remisión parcial en 60 a 70% de los pacientes y completa en 10 a 15%. Su mecanismo de acción es la disminución en la producción de autoanticuerpos por las células B. Si no hay remisión con los corticoides se realiza tratamiento de segunda línea.

Tratamiento de segunda línea: esplenectomía, anticuerpos monoclonales anti CD20 y fármacos citotóxicos.

Esplenectomía: tratamiento de preferencia en pacientes con resistencia a tratamientos de primera línea, por su eficacia a corto plazo y la buena tasa de respuesta inicial.

Anticuerpos monoclonales anti CD20: El más utilizado el *Rituximab*, un anticuerpo quimérico monoclonal anti CD20, molécula expresada en todas las células B. Su acción es destruir selectivamente las células B, disminuyendo con esto la producción de autoanticuerpos.

Fármacos citotóxicos: Los más utilizados de esta categoría son azatioprina y la ciclofosfamida. Su mecanismo de acción es disminuir la producción de autoanticuerpos, mediante un efecto mielosupresor. Puede ser administrado como

monoterapia o en combinación con corticoides. Otros medicamentos inmunosupresores como la ciclosporina o danazol han demostrado resultados variables en el tratamiento de la AHAI.

La terapia transfusional como tratamiento en pacientes con AHAI mediada por anticuerpos calientes debe ser evitada, dado que hay un riesgo significativo para la formación de aloanticuerpos y, además, la hemólisis en curso puede ser agravada por la transfusión, ya que los autoanticuerpos también reaccionan con los glóbulos rojos transfundidos. Se recomienda transfundir solo el volumen necesario, y con un monitoreo constante del paciente durante y después de la transfusión. El requisito mínimo es que los glóbulos rojos seleccionados deben ser compatibles para sistema ABO, los 5 antígenos mayores del sistema Rh y antígeno Kell. Y en caso de que el paciente presente además un aloanticuerpo identificado, deben carecer también del antígeno al cual está dirigido. Desde el punto de vista de la administración, esta debe realizarse a una velocidad de infusión lenta, considerando que células transfundidas serán destruidas al mismo ritmo que las células propias del receptor.

2.5.2. AHAI por anticuerpos fríos

En el plasma de un alto porcentaje de individuos sanos es posible detectar autoanticuerpos fríos benignos, que reaccionan con mayor intensidad cerca de los 4° C y son activos solo hasta temperaturas de 10 a 15°C, se encuentran en títulos inferiores a 64, por lo que no generan problemas serológicos ni clínicos. Sin embargo, estos autoanticuerpos se transforman en patológicos cuando actúan en un mayor rango térmico y títulos altos (> 1:1000).

Entre las AHAI por anticuerpos fríos se reconocen dos cuadros clínicos, Enfermedad de las aglutinas frías y Hemoglobinuria paroxística a frigori.

a) Enfermedad de las aglutininas frías

La Enfermedad de las aglutininas frías (EAF) es poco común representa el 10 - 20% de las AHAI.

Su incidencia es mayor en ancianos con predominio en mujeres, aparece como una enfermedad crónica secundaria a neoplasias de células B como linfoma, macroglobulinemia de Waldenstrom, a leucemia linfocítica crónica, pero lo habitual es que esté asociada a infecciones, particularmente a infección por Mycoplasma pneumonie y presencia de anticuerpos isotipo IgM contra antígeno I (sistema I ISBT 027). También se han descrito casos en mononucleosis infecciosa, con especificidad del autoanticuerpo anti-i (ISBT colección 207), y en VIH, hepatitis C, influenza, citomegalovirus, rubeola, varicela, sarampión, sífilis, malaria, endocarditis bacteriana, entre otros.

Fisiopatología: Cuando el paciente se expone al frío ocurre la reacción antígeno anticuerpo principalmente en zonas del cuerpo expuestas (punta de los dedos

de manos y pies, lóbulo de las orejas y punta de la nariz), donde la temperatura corporal puede fluctuar entre 28 y 31°C. La hemaglutinación obstruye la circulación capilar, causando entumecimiento, dolor y coloración azul de la piel; esta alteración circulatoria se conoce como acrocianosis o fenómeno de Raynaud, que en situaciones severas puede ocasionar gangrena de la zona afectada. La hemólisis que se produce en estos casos es intravascular, dado que la IgM es eficiente en la activación del complemento hasta llegar a un complejo ataque de membrana (C9) y también está involucrado el sistema retículo endotelial. El anticuerpo IgM se une a los glóbulos rojos a temperaturas por debajo de los 37°C. Conforme los hematíes retornan a la temperatura corporal, la IgM se disocia, dejando solo a C3b unido a la superficie del eritrocito. La IgM liberada puede entonces unirse a otras células a bajas temperaturas. Mientras el hematíe recubierto de C3b es detectado por receptores específicos de los macrófagos del sistema retículo endotelial sufriendo fagocitosis. Este proceso suele ser autolimitado, ya que con el tiempo los componentes C3b son hidrolizados a su forma inactiva (C3d), por inactivador C3 impidiendo que sean reconocidos por los macrófagos.

A pesar de que el síndrome generalmente tiene un curso leve, en algunos casos puede poner en peligro la vida del paciente. La forma secundaria a cuadros infecciosos, habitualmente se desencadena luego de 2 ó 3 semanas de iniciada la enfermedad y los signos más comunes son palidez e ictericia, mientras que la acrocianosis y la hemoglobinuria son infrecuentes.

Hallazgos de laboratorio

Hematológicos. Los valores de hemoglobina disminuyen moderadamente especialmente en periodos de invierno y climas fríos. El recuento de glóbulos rojos está artificialmente disminuido y la VCM está falsamente elevada produciendo un valor increíblemente alto de la CHCM, además como en todo cuadro hemolítico se observa reticulocitosis. Los glóbulos blancos y las plaquetas se mantienen normales en número y función. Dadas las características del anticuerpo involucrado es posible evidenciar aglutinación de los glóbulos rojos a temperatura ambiente, dificultando la preparación de los frotis y el trabajo de la muestra en contadores automáticos.

Bioquímicos. Los niveles de bilirrubina pueden estar levemente aumentados (no mayor a 3 mg/dL) al igual que la LDH.

Inmunohematológicos. La PAD es positiva con suero antiglobulina humano poliespecífico o anti-complemento C3d, como consecuencia de las fracciones del complemento que permanecen sensibilizando las células. Una vez detectada la presencia de crioaglutininas, debe estudiarse su título que habitualmente supera la dilución 1/1000 cuando se incuba a 4°C, y la amplitud térmica del autoanticuerpo que puede fluctuar entre 0°-32°C. Generalmente, el rango térmico del autoanticuerpo predice en forma más certera que el título, la patogenicidad del autoanticuerpo involucrado.

Si la PAD es negativa, la opsonización de los glóbulos rojos con anticuerpos puede ser confirmada utilizando lavados de baja fuerza iónica a 4°C, antes de adicionar un reactivo antiglobulina anti-IgM. Finalmente, la citometría de flujo puede ser utilizada para detectar glóbulos rojos recubiertos ya sea con autoanticuerpos o complemento. La IgMκ monoclonal sérica se puede demostrar por electroforesis en agarosa e inmunofijación en más del 90% de los pacientes.

La identificación de la especificidad del autoanticuerpo es solo una información adicional ya que no afecta el manejo clínico o transfusional del paciente. Por otra parte, es muy importante detectar la coexistencia de autoanticuerpos fríos y aloanticuerpos de importancia clínica, ya que estos últimos deben ser tomados en cuenta en la búsqueda de sangre compatible para una eventual transfusión, realizando una prueba cruzada a 37°C. En estos casos puede haber dificultad en la clasificación ABO y Rh, por lo que se recomienda realizar las pruebas a 37°C.

Tratamiento

Al ser esta una patología de afectación crónica, la terapia adecuada puede requerir solo que el paciente evite las temperaturas bajas. En los pacientes en que el cuadro es grave, la terapia se dirige a reducir la producción de anticuerpos por medio de inmunosupresión, ya que el uso de corticoides o la esplenectomía, no han mostrado resultados favorables. Está aprobado como tratamiento de segunda línea. el medicamento eculizumab, el cual corresponde a un anticuerpo monoclonal que impide la división de C5, previniendo los efectos citotóxicos y proinflamatorios de la activación del complemento, como también la disminución de la hemólisis intravascular. Cuando las transfusiones son necesarias, todas las pruebas pretransfusionales deben realizarse a 37 °C, para minimizar los efectos de los anticuerpos fríos y permitir la detección de aloanticuerpos.

b) Hemoglobinuria paroxística a frigori

La hemoglobinuria paroxística a frígori (HPF) es una AHAI producida por anticuerpos bifásicos. En este tipo, los autoanticuerpos producidos son de tipo IgG, siendo su especificidad hacia el antígeno P (sistema sanguíneo globósido ISBT 028). Tiene una frecuencia baja, de un 2%, y suele presentarse en niños, secundaria a infecciones. Su curso clínico es agudo y cursa con hemoglobinuria tras la exposición al frío, escalofríos, vómitos, fiebre, dolor renal, abdominal y de miembros inferiores. El anticuerpo se une al eritrocito en frío, luego el complejo antígeno-anticuerpo se separa, por tanto, no hay fagocitosis y la hemolisis se produce a 37°C, siendo la destrucción aguda a nivel intravascular por activación del complemento. Esta característica es demostrable en el laboratorio a través de la prueba de Donath- Landsteiner, dando así el nombre a estos anticuerpos.

En esta enfermedad los glóbulos rojos son hemolizados en el compartimiento intravascular por acción del autoanticuerpo de Donath-Landsteiner. Este autoanticuerpo al ser bifásico se une a los eritrocitos del paciente después de la exposición al frío, activa la fijación del complemento, y cuando las células sensibilizadas llegan a zonas

con mayor temperatura se gatilla la hemólisis intravascular, por medio de la generación del complejo de ataque a membrana, produciéndose como su nombre lo indica una hemoglobinuria paroxística o intermitente importante.

Los síntomas clínicos en los niños incluyen fiebre recurrente asociada con hemoglobinuria (síntoma principal), hemólisis e ictericia. La hepatoesplenomegalia ocurre en aproximadamente el 25% de los casos. El fenómeno de Raynaud, la urticaria por frío y la insuficiencia renal ocurren en algunos casos. La conexión con la exposición al frío no siempre es evidente. En adultos, el historial médico puede incluir sífilis, afecciones autoinmunes o enfermedad linfoproliferativa.

Hallazgos de laboratorio

Inmunohematológicos. Lo más característicos son los hallazgos asociados con una hemólisis intravascular aguda. La morfología eritrocitaria es usualmente normal. El diagnóstico definitivo es todavía basado en la prueba bifásica in vitro de Donath-Landsteiner. El suero del paciente se incuba con glóbulos rojos normales durante 30 minutos a 4^{o}C, seguido de un calentamiento a 37oC. La presencia de hemólisis en esta prueba "bifásica" indica un diagnóstico de HPF. La PAD es positiva si se realiza precozmente y usando suero antiglobulina específico para complemento. Si se realiza una incubación previa de la muestra a 4°C y lavados con solución salina fría podría obtenerse una reacción positiva con suero anti-IgG. La PAI también puede ser positiva si se realiza a 4°C, usando para los lavados solución salina fría al igual que en el caso anterior.

Tratamiento

La HPF es con frecuencia autolimitante con recuperación espontánea después de un pocos días o semanas con medidas de apoyo y evitar la exposición al frio. En los cuadros secundarios a infecciones es necesario tratar la enfermedad de base. En casos graves, si la anemia es severa requerirá transfusiones de sangre administradas con dispositivo de calentamiento. En casos con enfermedad crónica o refractaria, el tratamiento con rituximab se ha utilizado con éxito.

2.5.3. AHAI por mezcla de autoanticuerpos fríos y calientes, o tipo mixto

La AIHA mixta representa un 8 a 10% de las AHAI. Se diagnostica en pacientes con un TAD positivo para C3d e IgG, con coexistencia de un anticuerpo frío con una amplitud térmica ≥30oC y título alto (> 40) y un anticuerpo IgG caliente por TAI o eluado reactivo. Los signos y síntomas clínicos que estos pacientes manifiestan se deben a una hemólisis severa sin necesidad de exposición al frío. Se asocia a desórdenes linfoproliferativos, LES o también puede ser de etiología idiopática.

Los hallazgos de laboratorio muestran en alrededor de 2/3 de los pacientes con Hb <6 g /dL y un tercio con Hb 6-8 g /dL. Se presenta reticulocitopenia. En pruebas serológicas la PAD es positiva tanto por IgG como por complemento.

Los eluados muestran anticuerpos IgG inespecíficos y aglutininas frías con especificidad anti I.

En cuanto a tratamiento, AIHA mixtos con mayor frecuencia requieren 2 o más líneas de terapia, incluidos corticosteroides, rituximab, inmunosupresores y / o esplenectomía.

A continuación, la tabla 24.5 muestra una comparación de los hallazgos serológicos que se presentan en los diferentes tipos de AHAI descritas.

Tabla 24.5. Hallazgos serológicos en AHAI

Tipo	Mecanismo	DAT	Eluado	Especificidad
AHAI caliente	IgG (IgA)	IgG +/- C3	IgG	Panreactivo
EAF	IgM	C3	No reactivo	I> i> Pr
HPF	IgG bifásico	C3	No reactivo	P
Tipo mixto	IgG, IgM	IgG + C3	IgG	Panreactivo I/i

AHAI, Anemia hemolítica autoinmune; EAF, Enfermedad aglutininas frías; HPF, hemoglobinuria paroxística a frigore.

2.5.4. AHAI inducida por fármacos

Los medicamentos pueden causar diversos efectos colaterales, dentro de los cuales está el inducir producción anormal de anticuerpos que provocan la destrucción inmune de glóbulos rojos y otras células. Más de 150 fármacos se han asociado con el desarrollo de AHAI. La incidencia es baja, constituyendo entre el 12 a 18% de los casos de AHAI. Es importante determinar los fármacos que ingiere un paciente que presenta hemólisis sin una explicación aparente, en busca de una causa etiológica de esta situación.

Se han descrito categorías basadas en mecanismo de inducción a la formación de anticuerpos:

La primera categoría se debe a la drogodependencia, es decir, que activan una respuesta inmune solo mientras la droga está presente. Este es el tipo más común de AHAI relacionada a fármacos. Aquí se encuentran dos mecanismos:

a) Mediado por hapteno: reaccionan a un epítopo mixto compuesto de estructuras de los glóbulos rojos y el fármaco unido covalentemente.
b) Tipo inmunocomplejo: la unión del fármaco a los glóbulos rojos es por formación de inmunocomplejos.

La segunda categoría independiente del fármaco, que son capaces de estimular una respuesta autoinmune en ausencia de la droga. En esta categoría se han

descrito varios posibles mecanismos:
c) Formación de autoanticuerpos
d) por adsorción de proteínas, desregulación inmunológica u otro, que no ha sido completamente aclarado.

La tabla 24.6. muestra las drogas que más comúnmente inducen formación de Anticuerpos.

Tabla 24.6. Fármacos y mecanismos de inducción AHAI

Mecanismo hapteno	Complejo inmunológico / ternario	Formación autoanticuerpos	Adsorción de proteínas no inmunológica	Métodos desconocidos de causalidad AHAI
Penicilinas Cefalosporinas Tetraciclina Carbromal Hidrocortisona Oxaliplatino Tolbutamida	Estibofeno, Metformina, Quinina, Quinidina, Cefalosporinas Anfotericina b Rifampicina Antazolinc Tiopental Tolmetina Probenecid Nomifensina Cefalosporinas Diclofenaco Doxepina	Cefalosporinas Tolmetina α-metildopa L-dopa Ácido Mefenámico Tenipósido Pentostatina Cladribina Fludarabina Lenalidomida Procainamida Diclofenaco	Cefalosporinas Carboplatino, Cisplatino Oxaliplatino	Mesantoína Fenacetina Insecticidas Clorpromazina Acetaminofén Ibuprofeno Tiazidas, Omeprazol Carboplatino Ácido nalidíxico Eritromicina Estreptomicina

a) Mecanismo tipo hapteno

En este tipo de mecanismo la droga se une a la membrana del eritrocito en forma covalente sin causar daño a los eritrocitos. Este paso le otorga la antigenicidad necesaria para que se sinteticen anticuerpos dirigidos contra los epítopes de la droga que recubre a los hematiés. Los anticuerpos formados son predominantemente isotipo IgG, lo que explica que la mayoría de los eritrocitos recubiertos con la droga sean retirados de circulación por los macrófagos del bazo, haciendo que la hemólisis que predomine sea extravascular. El medicamento que clásicamente se describe en la literatura para este mecanismo es la penicilina. Se ha reportado que el 3% de los pacientes que se les administra altas dosis por vía intravenosa (> a 10 x 106 U/día) desarrollarán anticuerpos anti-penicilina.

Hallazgos de laboratorio. Esta anemia cursa con una PAD positiva por Ig G y rara vez positiva por Complemento. El suero del paciente y el eluado no muestran reactividad (PAI negativa) ya que se requiere células reactivo-cubiertas con la droga para que se produzca la sensibilización de los hematíes con el anticuerpo antidroga. Dado que personas sanas pueden tener títulos bajos de anticuerpos anti-penicilina, es necesario demostrar presencia de títulos altos para implicar a la droga como causa de la anemia hemolítica. La PAD permanece positiva varias semanas después y puede observarse un patrón de campo mixto en la PAD producto de que solo algunas células están cubiertas con la droga.

b) Complejo inmune ternario

El mecanismo fisiopatológico se inicia con la unión del fármaco a proteínas plasmáticas transportadoras originando un inmunógeno que estimula la formación de un anticuerpo anti-droga, predominantemente de isotipo IgM, este reacciona con la droga y se forma un complejo inmune que se une inespecíficamente al glóbulo rojo por medio de la región Fab del anticuerpo, formando una tri-molécula estable o también llamada complejo ternario, provocando que la destrucción de los glóbulos rojos esté mediada por la activación del sistema del complemento hasta C9, dando como resultado la lisis intravascular de los glóbulos rojos, que puede llevar al paciente a fallo renal, coagulación intravascular diseminada y/o muerte. Este mecanismo puede ser desarrollado con pequeñas dosis del fármaco.

Hallazgos de laboratorio. La hemólisis intravascular severa induce hemoglobinuria, hemoglobinemia que frecuentemente culmina con fallo renal. Las pruebas de coagulación como el TTPA, están prolongadas producto del consumo del factor VIII y fibrinógeno. La PAD es positiva para Complemento y negativa para Ig G, el eluado es no reactivo. In vitro, el suero del paciente reacciona con los glóbulos rojos incubados con la droga.

Es importante señalar que el término “autoinmune”, es inapropiado para designar a las anemias hemolíticas por drogas que provocan la hemólisis por los mecanismos anteriormente descritos, por el hecho de que los anticuerpos producidos son específicos a un componente exógeno (la droga) y no contra componentes propios del eritrocito.

c) Formación de autoanticuerpos

En este caso, a diferencia de los descritos anteriormente, los anticuerpos formados son verdaderos autoanticuerpos antieritrocitos. Se han descrito dos mecanismos para explicar su formación: a) que la droga interfiere con la función de los linfocitos T supresores, ayudando a la proliferación de células B; b) que la droga cause una alteración a los antígenos de los glóbulos rojos, creando nuevos epítopes, que no son reconocidos como propios.

El isotipo de autoanticuerpo formado es principalmente IgG, que se une a los eritrocitos, para ser retirados de circulación a través de fagocitosis. La droga

antihipertensiva alfa-metildopa (Aldomet), es la que con más frecuencia induce este tipo de mecanismo de hemólisis inmune y al ser un mecanismo independiente del fármaco, tiene la particularidad que la suspensión de la administración del fármaco no asegura la remisión del proceso hemolítico, lo que apoya el concepto de que el trastorno ocurre a nivel central. El desarrollo de los anticuerpos es dependiente de dosis y tiempo de administración de la droga.

Hallazgos de laboratorio. Los estudios hematológicos denotan disminución de la hemoglobina con reticulocitosis y esferocitosis. Esta anemia cursa con una PAD positiva por Ig G y Complemento. El eluado y el suero del paciente son reactivos con células reactivo-normales y no requieren incubación previa con la droga para obtener una PAI positiva. Un 30 % de los pacientes tratados con alfa-metildopa desarrollan una PAD positiva, sin embargo, menos del 1% desarrollan una anemia hemolítica significativa.

d) Adsorción de proteínas no inmunológica

Este mecanismo se ha utilizado para describir cómo algunos medicamentos parecen ser capaces de modificar la membrana de los eritrocitos, provocando una disminución de la vida media, sin mediar formación de un anticuerpo. Se ha demostrado una menor vida media de los glóbulos rojos en pacientes que reciben tratamiento con medicamentos que contienen inhibidores de ß-lactamasas y cefalosporina, aparentemente mediado por macrófagos. Se ha demostrado que la unión del medicamento modifica la membrana del hematíe, haciendo que sean capaces de adsorber IgG, C3, albúmina, fibrinógeno, entre otros, dando una PAD positiva. Esta unión no provoca hemólisis de los glóbulos rojos.

Las características serológicas de los principales mecanismos se resumen en la tabla 24-7.

Tabla 24-7. Hallazgos serológicos en AHAI por drogas

Clasificación	Mecanismo hapteno	Complejo inmunológico / ternario	Autoanticuerpos
PAI	No reactiva excepto que GR se recubran con la droga	Reactiva en presencia de la droga	Reactiva en ausencia de la droga
PAD	Positiva por IgG y A veces por IgG+C3d	Positiva por C3d	Positiva por IgG
ELUADO	No reactivo excepto que GR se recubran con la droga	No reactivo	Reactivo solo con IgG

Tratamiento AHAI producida por drogas: La medida más importante para el tratamiento de estas anemias hemolíticas es la interrupción de la droga, mientras que el laboratorio realiza las pruebas serológicas para establecer el diagnóstico definitivo. La hemólisis disminuirá dependiendo de mecanismo de acción de la droga, pudiendo ser rápida (complejo inmunitario), o dependiente de la concentración de droga en el plasma (tipo hapteno), y paulatina en el caso de producción de autoanticuerpos, ya que el fármaco no necesita estar presente para que el anticuerpo se una a los glóbulos rojos. Si la hemólisis es muy severa, puede haber administración de corticoides. En caso de ser necesario transfundir, deben realizarse las pruebas pretransfusionales de rutina para determinar grupo ABO y Rh, detección de aloanticuerpos y prueba cruzada, los que no debieran presentar mayores interferencias y dificultades en su realización.

AIHA en el embarazo

Como situación especial se considera la AHAI en el embarazo. Esta condición es rara y hay poca evidencia. La que se presenta es la AHAI por anticuerpos calientes con mayor frecuencia asociada con PTI (síndrome de Evans) o LES. Los autoanticuerpos IgG maternos puede atravesar la placenta por lo que PAD en sangre de cordón puede dar positivo y en algunos casos, se asocia con ictericia neonatal y anemia de aparición tardía en lactantes a las 4-6 semanas. El riesgo de pérdida fetal se asocia a abortos espontáneos o muertes intrauterinas lo que podría reflejar hemólisis en el útero análoga a la enfermedad hemolítica del feto y recién nacido. Las recomendaciones que se dan es la monitorización fetal con ecografía para evaluar el crecimiento fetal y la ecografía Doppler de la arteria cerebral media para detectar anemia fetal. Como estrategia de tratamiento es Prednisolona oral, a dosis mínima.

3. ANEMIAS HEMOLÍTICAS NO INMUNES

Las anemias hemolíticas extracorpusculares no mediadas por mecanismos inmunes corresponden a las asociadas a infecciones, agentes físicos y químicos.

3.1. Agentes infecciosos

3.1.1. Parasitosis

El Paludismo y la Babesiosis son las únicas dos parasitosis que producen anemia hemolítica adquirida.

a) Paludismo o Malaria

La malaria es una enfermedad infecciosa causada por un protozoo del género Plasmodium, cuya transmisión a los seres humanos se produce a través de la picadura de un mosquito hematófago del género Anopheles. La malaria es la principal causa de anemia en áreas endémicas. Existen 6 especies de Plasmo-

dium que provocan el Paludismo en el ser humano, de ellas *P. falciparum* provoca la forma más grave de malaria y *P. vivax* es la especie más frecuente.

El ciclo de vida de estos parásitos involucra diferentes estadios en el insecto vector y en el ser humano. En este último, el ciclo comienza con la inoculación de esporozoítos móviles durante la picadura del mosquito, formas invasivas que viajan por la sangre al hígado, donde comienza el desarrollo asexual tisular; transcurridos 10 a 12 días se produce la ruptura de los hepatocitos infectados, liberándose miles de merozoítos que invaden los glóbulos rojos, generando el ciclo asexual sanguíneo. En el ciclo eritrocitario, el parásito crece, se replica y libera merozoítos a la sangre para invadir nuevas células aproximadamente cada 48 horas para *P. falciparum, P. vivax* y *P. ovale,* provocando una periodicidad clínica de fiebre y tercianas. Para el caso *P. malariae,* este ciclo es de cerca de 72 horas. Luego de progresivas invasiones a eritrocitos, se inicia la fase sexuada en la cual los merozoitos entran a los eritrocitos, pero ya no se multiplican sino que se trasforman en formas masculinas o femeninas, llamadas micro y macrogametocitos, respectivamente. En este estado los parásitos son infecciosos para el mosquito.

La patogenia de la anemia en la malaria involucra diversos mecanismos: (a) Apoptosis eritrocitaria, la invasión eritrocitaria genera estrés oxidativo que induce activación de canales iónicos para permitir la entrada de iones necesarios para el parásito, pero también es un mecanismo de aceleración de la apoptosis eritrocitaria que sirve como línea de defensa del huésped. (b) Destrucción de eritrocitos parasitados y no parasitados, el estallido de los eritrocitos parasitados es responsable solo de un bajo porcentaje de la disminución del hematocrito, ya que el porcentaje restante se genera por la destrucción indirecta de las células parasitadas por acción de los macrófagos mediante mecanismos de fagocitosis, citotoxicidad mediada por anticuerpos y células natural killer. Por otro lado, los eritrocitos no infectados también sufren los efectos del estrés oxidativo, lo que genera en ellos alteraciones en la morfología, daño de la membrana, reducción de la capacidad de deformación, fragilidad osmótica y el depósito de inmunocomplejos, todo lo cual trae como consecuencia hemólisis intra y extravascular de ellos. (c) Diseritropoyesis. Hay evidencias de que los pacientes con paludismo grave tienen una maduración inadecuada de los precursores eritroides y por tanto una disminución en el recuento de reticulocitos. Este efecto puede ser atribuido a la producción intramedular de mediadores que suprimen la eritropoyesis tales como: citoquinas pro-inflamatorias, óxido nítrico, lipoperóxidos, entre otros y también al depósito intramedular de hemozoína o pigmento malárico. La detección de alta proporción de monocitos de sangre periférica conteniendo hemozoína se relaciona con alta carga parasitaria.

La confirmación de un cuadro de malaria se realiza mediante diagnóstico parasitario usando las siguientes técnicas. (a) Frotis y gota gruesa. La observación microscópica es el método *gold standard*, esta consiste en el hallazgo de los parásitos a través del frotis y la gota gruesa de sangre capilar o venosa, teñidos con Giemsa o Wright. (b) Prueba de diagnóstico rápido. Esta es una técnica in-

munocromatográfica que detecta proteínas propias del parásito. Cabe mencionar que esta técnica no sustituye a la microscopia, sino que la complementa. (c) Prueba de diagnóstico molecular, altamente sensible y específica que detecta secuencia del material genético del parásito. En caso de que no se confirme el diagnóstico con la primera muestra, pero continúa la sospecha clínica, se deben repetir las pruebas en un plazo de 12 horas aproximadamente, idealmente cuando el paciente presente alza de la temperatura.

b) Babesiosis (Piroplasmosis)

La babesiosis es una enfermedad zoonótica causada por una de las distintas especies del protozoo intra-eritrocitario del género Babesia que afectan a los seres humanos, que son: *B. microti, B. duncani, B. divergens* y *B. venatorum.* Este parásito infecta al ser humano a través de la picadura de una ninfa de garrapata - *Ixodes scapularis* o *Ixodes ricinus* infectada. El parásito también puede transmitirse a humanos por transfusión de sangre y eventualmente por transmisión transplacentaria.

Los parásitos Babesia infectan los eritrocitos directamente, se presentan de varias formas al interior de ellos, desde formas redondeadas u ovales y pequeñas, hasta formas de anillos. El parásito se reproduce dentro del eritrocito infectado hasta que este se rompe, liberando merozoítos que invaden otros eritrocitos.

La manifestación clínica de babesiosis varía desde una infección subclínica y asintomática a una enfermedad fulminante que provoca la muerte. La severidad del cuadro va a depender del estado inmunológico del paciente y la especie de Babesia involucrada. Los síntomas suelen comenzar de 1 a 4 semanas después de la picadura de la garrapata infectada y se presenta con fiebre acompañada de esplenomegalia, malestar y fatiga los que pueden durar de 1 a 2 semanas. En los pacientes inmunodeprimidos o ancianos se pueden producir infecciones más graves con anemia hemolítica, hemoglobinuria, coagulación intravascular diseminada y síndrome de dificultad respiratoria aguda, insuficiencia cardiaca congestiva, coma y muerte.

Para el diagnóstico de esta infección se utilizan las siguientes técnicas: (a) Identificación directa del parásito dentro del eritrocito, mediante la observación microscópica de frotis de gota fina y de gota gruesa de sangre periférica, teñidos con Giemsa. (b) Prueba de diagnóstico molecular como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) son altamente sensibles y específicas pues detectan secuencia del material genético del parásito. (c) Pruebas serológicas de detección de anticuerpos anti-babesia, se han desarrollado ensayos de inmunofluorescencia indirecta, de detección de anticuerpos IgM, los que usualmente son detectados 2 semanas después del inicio de los síntomas.

3.1.2. Infección bacteriana

Las bacterias pueden causar anemia hemolítica por acción directa de las exotoxinas producidas por microorganismos:

Sepsis clostridial. El género Clostridium está formado por un grupo heterogéneo de bacilos Gram positivos anaerobios esporulados. La hemólisis intravascular masiva y rápida se observa en el 7-15% de las bacteriemias por *C. perfringens* y en el 62,5% de los casos existe una comorbilidad asociada, tales como: neoplasia, hemopatía, diabetes, inmunodeprimidos. El foco infeccioso puede ser hepatobiliar, intestinal o uterino después de un procedimiento invasivo. El índice de mortalidad es del 80% si no es detectado tempranamente. El diagnóstico se sospecha cuando se presenta fiebre, ictericia y hemólisis intravascular. Se confirma con cultivos.

Bacteriemia por *Bartonella bacilliformis*. Esta bacteria es un cocobacilo Gram negativo aeróbico, intracelular, pleomórfico y móvil, con especial tropismo por el glóbulo rojo. Infecta a humanos a través de la picadura de mosquitos hematófogos del género Lutzomyia, endémico en Ecuador, Colombia y Perú. El cuadro clínico tiene dos fases clásicas: (a) Fase aguda, corresponde a la fase durante la cual *B. bacilliformis* infecta a los eritrocitos y se caracteriza por un período de incubación de 15 días y se presenta con fiebre, palidez, malestar general, hepatomegalia, ictericia, linfadenopatía y esplenomegalia, anemia hemolítica severa e inmunosupresión, y (b) Fase crónica, corresponde a la proliferación de células endoteliales. Los síntomas más comunes son sangrado de las verrugas, fiebre, malestar, artralgias, anorexia, mialgias, palidez, linfadenopatía y hepato-esplenomegalia. En cuanto al diagnóstico, el frotis de sangre puede mostrar los cocobacilos adheridos a los eritrocitos. El hemograma muestra leucocitosis con desviación izquierda, la gran mayoría desarrolla anemia hemolítica grave. El hemocultivo confirma el diagnóstico. El estudio en biología molecular mediante PCR permite mayor rapidez y sensibilidad en el diagnóstico en comparación con el frotis sanguíneo, especialmente si hay baja parasitosis.

3.2. Venenos

3.2.1. Venenos de arañas

Todas las arañas producen veneno, pero solo algunas son peligrosas para el hombre. Las arañas de género *Loxosceles* puede producir un cuadro clínico que incluye complicación hemolítica.

La araña *Loxosceles laeta* (araña de los rincones) es el principal agente involucrado, mide aproximadamente un centímetro, tiene el abdomen con aspecto aceitunado, con abundante pilosidad y es de color café pardusca. Su veneno contiene varias toxinas, incluyendo fosfatasas alcalinas, hialuronidasas, metaloproteinasas, esfingomielinasa D y péptidos neurotóxicos. La gravedad del cuadro clínico va a depender de la extensión y la profundidad de la lesión cutánea,

la cantidad de veneno inyectado por kilo de peso corporal, la susceptibilidad individual y la eventual difusión al sistema circulatorio con daño sistémico.

Los síntomas son las manifestaciones del daño inmediato producto de la acción citotóxica y proteolítica sobre los endotelios vasculares. Los cuadros producidos por la mordedura de las arañas del género Loxosceles adoptan dos formas clínicas, loxoscelismo cutáneo y loxoscelismo sistémico: (a) El loxoscelismo cutáneo se manifiesta por dolor indefinido y eritema que puede evolucionar a una ulcera necrótica, ocurre en aproximadamente un 90% de los casos, es habitualmente de comienzo brusco. Existen dos tipos de loxoscelismo cutáneo: el necrótico (más frecuente) y el edematoso (raro). (b) El loxoscelismo sistémico (cutáneo visceral), es la complicación más seria del loxoscelismo, y presenta alta letalidad si no es tratado. Se inicia de manera similar al loxoscelismo cutáneo, pero alrededor de las 12-24 horas posteriores a la mordedura, aparecen síntomas, signos y complicaciones derivadas principalmente de una rápida y progresiva hemólisis intravascular, en el ámbito hematológico implica ictericia, hematuria y hemoglobinuria que pueden conducir a insuficiencia renal.

El diagnóstico del loxoscelismo es esencialmente clínico y se basa en el antecedente epidemiológico de la mordedura y su circunstancia, el examen de la araña o sus restos en los casos que es posible, y las características de las lesiones y en su progresión. No existen exámenes de laboratorio que confirmen el diagnóstico. Los exámenes de laboratorio se alteran de modo marcado en los casos sistémicos, indicando la existencia de anemia hemolítica intravascular y daño renal secundario.

El manejo de los casos de compromiso sistémico, incluye hidratación, corrección de las alteraciones hidroelectrolíticas, oxigenoterapia y manejo de la falla renal. En estos casos se recomienda el uso de corticoide. De haber falla renal e hiperkalemia se ha indicado la hemodiálisis o peritoneo diálisis y en pacientes en coma profundo, Coagulación intravascular diseminada (CID), con signos de hemólisis intensa y refractaria, se recomienda el uso de la exsanguíneo transfusión y la plasmaféresis. Recientemente se publicó un promisorio tratamiento en base al uso de anticuerpos monoclonales capaces de neutralizar las principales proteínas responsables de las manifestaciones clínicas.

3.2.2. Veneno de serpientes

Las mordeduras de serpientes venenosas pueden constituir emergencias médicas por parálisis grave de los músculos respiratorios, trastornos hemorrágicos, insuficiencia renal, entre otras complicaciones.

Los venenos de las serpientes son mezclas complejas que incluyen enzimas, toxinas y péptidos.

Los cuadros patológicos que generan los venenos de serpientes se clasifican en neurotóxico y hemotóxico. Este último cuadro está mediado por fosfolipasa

A2, metaloproteasas, lectinas y desintegrinas, y afecta tanto a las células sanguíneas, como a los factores de la coagulación. El principal tratamiento es la administración precoz del antídoto.

3.3. Fármacos oxidantes

Ciertos fármacos pueden actuar con el oxígeno molecular formando radicales libres y peróxidos que denaturan la hemoglobina y dañan la membrana del glóbulo rojo. La membrana del eritrocito sufre varias modificaciones de sus componentes como lípidos peroxidados y sialilación de glicoproteínas. Los radicales de oxígeno generados por la oxidación de la hemoglobina también contribuyen a la formación de cuerpos de Heinz, proteólisis intracelular y peroxidación de los lípidos de la membrana.

La anemia producida por hemólisis oxidativa intravascular se puede presentar de 1 a 3 días después de la administración de ciertos fármacos, entre otros: antipalúdicos, antipiréticos/analgésicos, sulfonamidas y nitrofuranos.

3.4. Agentes físicos

3.4.1. Quemaduras

El cuadro de una persona que ha sufrido quemaduras puede verse exacerbado por hemólisis aguda. El calor puede causar destrucción directa de eritrocitos, disminución en su vida media o por una anemia hemolítica microangiopática. A pesar de que en quemaduras extensas la masa eritrocitaria puede disminuir entre un 3 y 15%, debido a la pérdida de plasma, el paciente inicialmente presentará un aumento del hematocrito. Posterior al trauma inicial, se hace evidente una anemia hemolítica con presencia de esquistocitos, esferocitos y crenocitos, por reducción de la elasticidad de la membrana. La administración de eritropoyetina humana recombinante permite reducir la cantidad y frecuencia de transfusión de concentrado de glóbulos rojos.

3.4.2. Radiaciones ionizantes

La radiación ionizante a dosis grandes puede afectar la hematopoyesis que se puede expresar en pancitopenia. No existen claras evidencias que las radiaciones ionizantes induzcan anemia hemolítica, pero estudios *in vitro* muestran que los glóbulos rojos resisten hasta 20.000 Rad. Los eritrocitos son menos sensibles que los leucocitos y plaquetas a las radiaciones. Los daños de estas células no se hacen manifiestos hasta transcurridas varias semanas, y la recuperación total puede tardar varios meses. En el hemograma, los eritrocitos suelen tener aspecto normal, pero en algunos casos se puede presentar anisocitosis (con macrocitosis) y poiquilocitosis. Generalmente no se observa policromatofilia.

3.5. Productos químicos

3.5.1. Arsénico

La toxicidad del arsénico depende de su estado de oxidación y su solubilidad. La hemoglobina puede fijar la arsina lo que conducirá a lisis de glóbulos rojos. Entre otras manifestaciones, generalmente a las 2-24 horas, puede presentar anemia hemolítica intravascular la que se puede expresar en policromatofilia, reticulocitosis, leucocitosis, orina de color oscura, hemoglobinuria, ictericia, evento renal agudo y a veces oliguria.

3.5.2. Cobre

La anemia asociada al Cu+2 puede deberse a: (a) Oxidación de la hemoglobina, (b) Inactivación en la vía glicolítica, (c) Daño de la membrana celular y (d) Aumento de la fragilidad osmótica.

La intoxicación por cobre provoca hemólisis intravascular seguida de insuficiencia hepática y renal que puede ser mortal. La anemia hemolítica ocurre en las primeras 12-24 horas con oxidación del grupo hemo para formar metahemoglobina. Este proceso causa cianosis y sangre color chocolate. El paciente puede experimentar ictericia debido a daño hepático y hemólisis. Es importante evaluar metahemoglobina, ya que se correlaciona con la gravedad.

La anemia hemolítica por acumulación de cobre se puede asociar, como primera manifestación de la enfermedad de Wilson, enfermedad hereditaria en la que se acumula cobre en los tejidos.

3.5.3. Anhídrido trimetílico

Es causante de anemia hemolítica y síntomas respiratorios. Anhídrido trimetílico se utiliza en la industria de marcos y manufactura de plásticos. La causa de hemolisis es poco conocida, pero se cree que mecanismos inmunológicos pueden jugar algún papel.

4. LECTURAS SUGERIDAS

Anemias hemolíticas inmunes

AABB: Manual Técnico Asociación Americana de Bancos de Sangre, 20ª edición, 2020.

Berentsen S, Sundic T, Hervig G, Tjonnfjord E. Autoimmun hemolytisk anemi. Medsin Og Vitenskap. Tidsskr Nor Legeforen. 2009;21:2226-31.

Bergeron, D., Adams, S. “Autoimmun hemolytic anemias and drug-induced hemolytic anemias” En Immunohematology principles and practic. Eds. Quinley E. Chapter 16. Lippincott-Raven, Philadelphia. 2011 (3nd Ed.).

Dacie, J., Lewis S.M.. and Waters, H. “Serological investigation of auto-immune and drug-induced immune haemolytic anaemias” In Practice Haematology. Eds. Dacie J, Lewis SM. Chapter 29. Seventh edition. Churchill Livingstone, London 1991.

De Haas M, Thurik FF, Koelewijn JM, van der Schoot CE. Haemolytic disease of the fetus and newborn. Vox Sang 2015; 109:99–113.

Delaney M, Matthews DC. Hemolytic disease of the fetus and newborn: managing the mother, fetus, and newborn. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2015; 2015:146–51.

Denomme GA, Anani WQ. Mass-scale red cell genotyping of blood donors: from data visualization to historical antigen labeling and donor recruitment. Transfusion. 2019; 59(9):2768-2770.

Flegel WA. Pathogenesis and mechanisms of antibody-mediated hemolysis Transfusion. 2015; 55(0): S47–S58.

Franchini M. et al. Red blood cell alloimmunisation in transfusion-dependent thalassaemia: a systematic review. Blood Transfus. 2019; 17(1):4-15)

Garratty G. Drug-induced immune hemolytic anemia. American Society of Hematology. 2009;1: 73 -9.

Go R, Winters J, Kay N. How I treat autoimmune hemolytic anemias. Blood. 2017; 129:2971-9.

Hansen D, Möller S, Andersen K, Gaist D, Frederiksen H. Increasing Incidence and Prevalence of Acquired Hemolytic Anemias in Denmark, 1980–2016. Clinical Epidemiology 2020:12 497–508.

Hill A, Hill QA. Autoimmune hemolytic anemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2018; 30: 328-89.

Hashem AEA., et al. Red blood cell alloantibodies in healthy Egyptian blood donors. Egypt J Hosp Med. 2018; 72:4913–8.

Harewood J, et al. Hemolytic Transfusion Reaction 2020. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan–. PMID: 28846280.

Harmening, D., Ann, L., Green, R. “Autoimmun hemolytic anemias”. In Moderm blood banking and transfusion pactices. (6th Ed) 2012. F.A. Davis Campany, Philadelphia. 543 p.

Hellberg A. P1PK: a blood group system with an identity crisis. Vox Sanguinis 2020: 15, 40–45.

Hendrickson J Delaney M. Hemolytic Disease of the Fetus and Newborn: Transfusion Medicine Reviews. 2016; 30:159–164.

ISBT. Red Cell Immunogenetics and blood group terminology. Disponibles en: https://www.isbtweb.org/working-parties/red-cell-immunogenetics-and-blood-group-terminology.

Jäger, U, Barcellini W, Broomec C, Gertzd M, Hille A, Jilmaf B, Kuterg D, Michelh M, Montilloi M, Röthj A, Zeerlederk A, Berentsenn S. Diagnosis and treatment of autoimmune hemolytic anemia in adults: Recommendations from the First International Consensus Meeting. Blood Reviews 41 (2020) 100648. https://doi.org/10.1016/j.blre.2019.100648.

Kapur R., Della Valle L., Sonneveld M, Hipgrave Ederveen A, Visser R, Ligthart P, et al. Low anti-RhD IgG-fc-fucosylation in pregnancy: a new variable predicting severity in haemolytic disease of the fetus and newborn. Br J Haematol. 2014; 166:936–45.

Lambin, P., Debbia, M., Puillandre, P., Brossard, Y. IgG1 and IgG3 anti-D in maternal serumand on the RBCs of infants suffering from HDN: relationship with the severity of the disease. Transfusion. 2002; 42:1537–46.

Maldonado M, Toro C. Anemias hemolíticas autoinmunes, diagnóstico y tratamiento. Hematología 2020. Volumen 24 N^{o} 1:70-80.

Merle, NS. et al. Complement activation during intravascular hemolysis: Implication for sickle cell disease and hemolytic transfusion reactions. Transfusion Clinique et Biologique. 2019; 26:116–124.

Moinuddin, IA. Et al. Acute Intravascular Hemolysis Following an ABO Non-Identical Platelet Transfusion: A Case Report and Literature Review. Am J Case Rep. 2019; 20:1075-1079.

Palomo, I., Pereira, J., Vásquez, M. “Citopenias inmunes” En Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica, Palomo, I., Ferreira, A., Sepúlveda, C., Rosemblatt, M., Vergara, U. Capítulo 26, Editorial Universidad de Talca, 2002.

Palomo, I., Pereira, J. Fisiopatología de las citopenias inmunes, Editorial Universidad de Talca, 1995.

Panch, SR, et al. Hemolytic Transfusion Reactions. N Engl. J Med. 2019; 381(2):150-162.

Pegorano V, Urbinati I, Visser G, Di Renzo GC, Zipursky A, Stotler B, Spitalnik S. Hemolytic disease of the fetus and newborn due to Rh(D) incompatibility: A preventable disease that still produces significant morbidity and mortality in children. Published online 2020 Jul 20. doi: 10.1371/journal.pone.0235807.

Roumenina LT et al. The role of Complement in Post-Transfusion Hemolysis and Hyperhemolysis Reaction Transfusion Medicine Reviews, 2019; 33(4): 225–230.

Slootweg Y, Lindenburg I, Koelewijn J, Van Kamp I, Oepkes D, De Haas M. Predicting anti-Kell-mediated hemolytic disease of the fetus and newborn: diagnostic accuracy of laboratory management. Am J Obstet Gynecol 2018 Oct;219(4):393-98.

Smart, E., Armstrong, B. Blood group systems. Vox Sang ISBT Science Series. 2020; 15: 123-150.

Storry, JR, et al. International Society of Blood Transfusion Working Party on Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology: Report of the Dubai, Copenhagen and Toronto meetings. Vox Sang. 2019; 114(1):95-102.

Vásquez, M., Maldonado, M. Sistema Sanguíneos Eritrocitarios de Importancia Clínica Editorial Universidad de Talca, 2012. 126 p .

Anemias hemolíticas no inmunes

Angelakis, E., Raoult, D. Pathogenicity and treatment of Bartonella infections. International Journal of Antimicrobial Agents 2014; 44(1): 16–25.

Bezerra da Silva G. et al. Acute kidney injury complicating bee stings – a review. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2017; 1;59:e25.

Bushberg J. Lesiones causadas por la radiación. DABMP, School of Medicine, University of California, Davis. Última revisión ene. 2021.

Costa TGF, et al Engineered antigen containing epitopes from Loxosceles spp. spider toxins induces a monoclonal antibody (Lox-mAb3) against astacin-like metalloproteases. Int J Biol Macromol. 2020;162:490-500.

De la Cruz GG. Usefulness of erythropoietin in seriously burned patient with anemia. Topic review. Gaceta Médica Espirituana. 2020;22(1):60-70.

Gay, J., Garçon, L., Coppo, P. Anemia hemolítica no inmunitaria. EMC - Tratado de Medicina, 2016; 20(4):1–7.

Mentzer WC, Schrier SL. Extrinsic nonimmune hemolytic anemias. In: Hoffman R, Benz EJ, Silberstein LE, et al, eds. Hematology: Basic Principles and Practice. 7th ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2018:chap 47.

MINSAL. Orientaciones técnicas para el diagnóstico y tratamiento de malaria en Chile, 2015. Disponible en: https://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2016/09/Orientaciones-t%c3%a9cnicas-para-el-diagn%c3%b3stico-y-tratamiento-de-la-Malaria-en-Chile-2015.pdf.

MINSAL. Guía para el Manejo de Mordedura de Araña de los Rincones - Loxosceles laeta 2016, Disponible en https://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2016/11/LOXOSCELES-FINAL.pdf.

Perestrelo AP, Miranda G, Gonçalves M, Belino G, Ballesteros R. Chronic Copper Sulfate Poisoning. European Journal of Case Reports in Internal Medicine © EFIM 2021.

Pérez Nogués, M. et al. Estudio del veneno de serpientes: tipos y tratamientos Revista complutense de ciencias veterinarias. 2008; 2 (2):100-104.

Vannier, E., Krause, P. Human Babesiosis. N Engl J Med 2012; 366:2397-2407.

Vásquez, A., Tobón A. Mecanismos de patogenia en la malaria por *Plasmodium falciparum*. Biomedica 2012; 32(Supl.):106-20.

White NJ. Anaemia and malaria. Malar J. 2018;17(1):371.

SECCIÓN 2.3 **SERIE BLANCA**

Capítulo 25. Alteraciones cuantitativas de los Leucocitos

Capítulo 26. Leucemia Mieloide Crónica

Capítulo 27. Trombocitosis Esencial

Capítulo 28. Policitemia Vera

Capítulo 29. Mielofibrosis

Capítulo 30. Leucemia Linfática Crónica

Capítulo 31. Gammapatías Monoclonales

Capítulo 32. Linfomas

Capítulo

25

ALTERACIONES CUANTITATIVAS DE LOS LEUCOCITOS

Carolina Espinoza R., Eduardo Fuentes Q., Iván Palomo G. y Marcelo Alarcón L.

Resumen

1. Introducción

2. Leucocitosis
- 2.1 Neutrofilia
  - 2.1.1 Neutrofilia aguda
  - 2.1.2 Neutrofilia crónica
- 2.2 Otras leucocitosis

3. Leucopenias
- 3.1 Neutropenia
  - 3.1.1 Neutropenias congénitas
  - 3.1.2 Neutropenias adquiridas
- 3.2 Otras leucopenias

4. Lecturas sugeridas

RESUMEN

Los leucocitos forman parte del sistema inmune que nos proteje de contraer varias enfermedades como lo son las infecciones. De los leucocitos, las células más abundantes son los neutrófilos cuya principal función es la de fagocitosis. Estos tienen una vida media entre 8 a 20 hrs, la cual se puede prolongar en varias horas cuando estos migran a tejidos infectados o inflamados, de ahí su gran importancia para nuestro organismo. Cualquier alteración en su número está asociada con alguna enfermedad. Dentro de los procesos que se ven alterados se encuentran las neutrofilias que es el aumento agudo o crónico de los neutrófilos, estas principalmente se ven asociadas a infecciones o leucemias. La otra condición son las neutropenias que pueden ser adquiridas o congénitas, en donde pueden estar asociadas a post-infecciones o ligadas al cromosoma X. En todas estas condiciones la consecuencia de las alteraciones en el número son las infecciones repetidas.

1. INTRODUCCIÓN

La interpretación del hemograma para el diagnóstico de patologías hematológicas, ya sean malignas y no malignas, no solo depende de las características morfológicas y funcionales de las células, sino que también del recuento de ellas. Los parámetros de los leucocitos en el hemograma, permiten realizar un análisis cualitativo y cuantitativo. En este capítulo nos referiremos al análisis cuantitativo de los glóbulos blancos, el cual nos permite determinar el recuento total y diferencial, ya sea por medio de la formula leucocitaria, así como también de forma automatizada determinando el número absoluto de leucocitos específicos por microlitros de sangre.

Las alteraciones cuantitativas dan cuenta del número de leucocitos en relación con los valores normales, dependiente del género, la edad, la etnia y el embarazo. Dependiendo del estado fisiológico de cada individuo, los leucocitos pueden estar disminuidos (leucopenia) o aumentados (leucocitosis). Además de lo anterior, es posible determinar qué tipo de célula leucocitaria está cuantitativamente afectada.

2. LEUCOCITOSIS

Se define como el aumento del recuento total de leucocitos en relación con el límite superior normal esperado, considerando edad, condiciones fisiológicas y etnia. Se han identificado cuatro mecanismos principales que desencadenan la leucocitosis:

1. Aumento en la producción, dependiente del número de precursores mieloides y linfoides en médula ósea.
2. Aumento en la velocidad de liberación celular desde los compartimientos de reserva.

3. Demarginación de los leucocitos, que previamente fueron desplazados hacia la periferia del endotelio vascular, los cuales entran a circulación.
4. Aumento de la permanencia de los leucocitos en circulación, al disminuir su salida desde los vasos sanguíneos hacia los tejidos, lo que se denomina extravasación.

Existen múltiples factores que pueden desencadenar el inicio de la leucocitosis, sin embargo los más comunes suelen ser por respuestas fisiológicas normales del organismo producto de algún proceso inflamatorio o infeccioso, donde el aumento de glóbulos blancos es principalmente de polimorfonucleares, además de las diferentes formas que no han completado su proceso de maduración reflejándose un desplazamiento a la izquierda en la fórmula leucocitaria.

Los glóbulos blancos que pueden verse aumentados en circulación son polimorfonucleares correspondientes al aumento de neutrófilos (neutrofilia), eosinófilos (eosinofilia) y en casos menos frecuentes basófilos (basofilia). También bajo ciertas condiciones se pueden desencadenar procesos fisiológicos con aumento en circulación del número de mononucleares correspondientes a linfocitos (linfocitosis) y monocitos (monocitosis). A su vez, ciertos eventos fisiopatológicos pueden desencadenar un aumento en circulación de células inmunes inmaduras, como es el caso de las leucemias.

2.1 Neutrofilia

La leucocitosis de este tipo celular es la más frecuente. Los neutrófilos constituyen el 40 al 60% aproximadamente del recuento total de leucocitos en personas adultas. Si bien los individuos pueden presentar variaciones levemente aumentadas de los niveles de neutrófilos circulantes durante el día, producto del estrés, posterior a las comidas o por la postura corporal, estas variaciones no son a causa de patologías subyacentes, por lo que solo el aumento del recuento absoluto de neutrófilos superior a 2 desviaciones estándar por sobre la media, se deberá considerar como neutrofilia.

La neutrofilia se puede clasificar según la causa, como primaria por desregulación en la producción de neutrófilos en médula ósea o secundaria por estímulos extrínsecos a la médula ósea, los que desencadenan una respuesta que promueve el aumento de la producción de neutrófilos. Otra clasificación depende del tiempo de desarrollo de la neutrofilia, pudiendo ser aguda la cual se evidencia en cortos periodos de tiempo, de horas a días posterior al desencadenante, o puede ser crónica en que la neutrofilia es evidente durante largos periodos de tiempos, inclusive años.

2.1.1 Neutrofilia aguda

Dos tipos de neutrofilias agudas son las que se pueden identificar. La primera es aquella conocida como pseudoneutrofilia desencadenada por situaciones de estrés que provocan demarginación y el segundo tipo por aumento en la libe-

ración de neutrófilos desde el compartimiento de almacenamiento en médula ósea.

Pseudoneutrofilia. Es inducida por ejercicio intenso, traumas, cirugías, quemaduras, estrés físico y emocional, siendo el principal responsable la producción de catecolaminas como epinefrina, entre otras. La liberación de epinefrina desde la médula suprarrenal hacia la circulación mediará respuestas a corto plazo frente a los diferentes factores estresantes, aumentando la cantidad total de neutrófilos circulantes en pocas horas. Este tipo de neutrofilia aguda por demarginación, por lo general está acompañada de un aumento de linfocitos y monocitos en sangre.

Liberación de neutrófilos desde el compartimiento de almacenamiento en médula ósea. Es inducida por infecciones e inflamación, bajo estas circunstancias se produce aumento en circulación desde el "pool" de almacenamiento con liberación de neutrófilos segmentados y desde el "pool" de maduración con liberación de neutrófilos en bandas o baciliformes, por lo que en el hemograma se puede evidenciar desviación a la izquierda, dependiente del proceso inflamatorio. Los factores estimulantes de colonia (GM-CFU y G-CFU) cumplen un rol importante en la estimulación de la producción de neutrófilos y la movilización de estas células desde la médula ósea, desencadenando la neutrofilia aguda. Las infecciones bacterianas agudas ya sean, localizadas o sistémicas, son la causa más común de neutrofilia; son menos frecuentes las neutrofilias por hongos, parásitos y virus. La inflamación, estrechamente relacionada con los procesos infecciosos también puede originarse por procesos no infecciosos, por necrosis tisular o exposición a químicos y/o toxinas. Los glucocorticoides endógenos, por ejemplo, en el estrés crónico o por administración exógena del mismo, están involucrados en este tipo de mecanismo, además de desencadenar la demarginación y la disminución de la extravasación de este tipo de glóbulos blancos, lo que generalmente está acompañado de una disminución de linfocitos y monocitos en sangre.

2.1.2 Neutrofilia crónica

Se da a lugar por una prolongada permanencia de los factores desencadenantes, los cuales estimulan de forma continua la proliferación de los precursores de neutrófilos. Así las infecciones que permanecen en el tiempo y que en primera instancia originan neutrofilia aguda posteriormente darán lugar a la neutrofilia crónica. Las enfermedades no infecciosas crónicas como diversas alteraciones hematológicas (Ej. trastornos mieloproliferativos y hemorragia crónica), neoplasias, trastornos metabólicos y endocrinos, enfermedades inflamatorias crónicas (Ej. artritis reumatoide y pancreatitis), trastornos congénitos (Ej. Síndrome de Down y asplenia congénita), además de exposición prolongada a ciertas drogas, hormonas, toxinas y factores de crecimientos exógenos (G-CFU), pueden dar origen a este tipo de neutrofilia. El mecanismo describe una estimulación de la división celular en el compartimiento mitótico correspondiente a promielocitos y mielocitos, para posteriormente aumentar la cantidad celular postmitótica y de

esta forma contribuir con el aumento del compartimiento de almacenamiento en médula ósea, desde donde se liberarán los neutrófilos a circulación. En la tabla 25-1 se mencionan los tipos de neutrofilias.

Tabla 25-1. Tipos de Neutrofilias

Tipo de Neutrofilias	Mecanismo involucrado	Factores desencadenantes
Neutrofilia aguda	Pseudoneutrofilia por demarginación.	- Ejercicio intenso, traumas, cirugías, quemaduras, estrés físico y emocional por producción de catecolaminas.
	- Liberación de neutrófilos segmentados desde el "pool" de almacenamiento. - Liberación de baciliformes desde el "pool" de maduración.	- Infecciones e inflamación. - Inflamación no infecciosa (necrosis tisular o exposición a químicos y/o toxinas). - GM-CFU y G-CFU - Glucocorticoides endógenos o exógenos.
Neutrofilia crónica	Prolongada permanencia de los factores desencadenantes. Estimulación de la división celular en el "pool" mitótico y posteriormente aumento en "pool" de almacenamiento.	- Infecciones que permanecen en el tiempo. - Alteraciones hematológicas neoplasias, trastornos metabólicos y endocrinos, enfermedades inflamatorias crónicas, trastornos congénitos. - Exposición prolongada a ciertas drogas, hormonas, toxinas y G-CFU exógeno.

2.2 Otras leucocitosis

Los eosinófilos representan del 0 al 4% de los leucocitos en sangre periférica en adulto, y cuando existe un aumento superior al 10% en la fórmula leucocitaria y por tanto los recuentos absolutos de eosinófilos circulantes en sangre son elevados, se define como **eosinofilia**. Por lo general se desencadena secundaria a infecciones por parásitos helmínticos, por trastornos alérgicos, asma, afecciones dermatológicas, entre otras. Los basófilos corresponden a menos del 1% de leucocitos en circulación de los adultos, aumento de basófilos circulantes o **basofilia**, puede verse reflejada en respuestas inflamatorias y en reacciones de hipersensibilidad inmediata. Los linfocitos representan del 20 al 30% de los leucocitos totales en periferia. La evidencia del aumento de estos porcentajes en la fórmula leucocitaria y en el recuento total absoluto o **linfocitosis**, denota respuestas frente a infecciones virales agudas, como por ejemplo en la mononucleosis infecciosa causada por el virus Epstein-Barr o también pueden

ser producto de alteraciones neoplásicas malignas como la leucemia linfocítica aguda (LLA) y la leucemia linfocítica crónica (LLC). La linfocitosis fisiológica se evidencia desde los 4 meses hasta los 4 años de edad. Los monocitos representan el 4 al 10% de glóbulos blancos en sangre periférica de individuos adultos, el aumento de dichos porcentajes o del recuento absoluto, denominado **monocitosis**, generalmente es transitorio, y puede ser señal de que el organismo está respondiendo a infecciones bacterianas crónicas intracelulares, por ejemplo, en tuberculosis. Se considera monocitosis fisiológica aquella que presentan los recién nacidos sin anormalidades. Además, el infarto al miocardio, la recuperación posterior a la agranulocitosis, lesiones térmicas, el parto y el esfuerzo físico en maratonistas están asociados a monocitosis.

3. LEUCOPENIAS

Las alteraciones con disminución de la cantidad de leucocitos totales en sangre periférica se denominan leucopenias. Este recuento disminuido puede afectar a todos los tipos de glóbulos blancos o a un tipo específico, pudiendo desencadenarse por diversas condiciones fisiológicas y patologías. La leucopenia más común, con altos riesgo de infecciones graves es la que afecta a los neutrófilos circulantes y se denomina neutropenia, si existe disminución de los eosinófilos circulantes se denomina eosinopenia, disminución de basófilos circulantes basopenia. Los leucocitos mononucleares en circulación también pueden sufrir alteraciones que involucran recuentos disminuidos, en tal caso si afecta a monocitos se denomina monocitopenia y si afecta a linfocitos, se denomina linfocitopenia. Los cuatro mecanismos involucrados en el origen de las leucocitosis y que frecuentemente se asocian a las neutropenias son:

1. Disminución de la producción de leucocitos.
2. Alteraciones en la distribución de los leucocitos producidos hacia la circulación.
3. Aumento de la marginación de los leucocitos.
4. Aumento de la destrucción de leucocitos en sangre periférica.

3.1 Neutropenia. Un recuento absoluto de neutrófilos (segmentados y baciliformes) menor a 2000 células por microlitro de sangre podría desencadenar manifestaciones clínicas con relación al grado de disminución. Así, una neutropenia leve corresponderá a recuentos absolutos de neutrófilos entre 1000 a 1500 células por microlitro, la neutropenia moderada, recuentos absolutos de 500 a 1000 células por microlitro y se considera grave si la neutropenia se presenta con valores absolutos menores a 500 células por microlitro, permitiendo clasificarlas según su severidad. Recuentos menores a 200 células por microlitro se considera agranulocitosis, y tanto la neutropenia grave como la agranulocitosis, pueden ser producto de trastornos que impiden la normal producción de estas células hematopoyéticas en médula ósea o por su destrucción en circulación de forma masiva. El grado de neutropenia generalmente es proporcional al riesgo de infección (a mayor gravedad de neutropenia es mayor el riesgo de infección) o es inversamente proporcional al recuento de neutrófilos en sangre, sin embargo, si el compartimiento de almacenamiento de neutrófilos en médula ósea es

adecuado aún con recuentos bajos en circulación, puede no existir susceptibilidad a infección. Las neutropenias, también se pueden clasificar dependiendo de la etiología, en neutropenias congénitas y neutropenias adquiridas.

3.1.1 Neutropenias congénitas

Este tipo de neutropenia se evidencia en edades tempranas. Se caracteriza por una disminución crónica (mayor a 6 meses) del recuento absoluto de neutrófilos en circulación, dicha disminución puede ser de carácter permanente o intermitente, y se puede presentar de forma aislada o estar asociada a otras enfermedades genéticas. Por lo general las neutropenias congénitas son raras y poco frecuentes, producto de mutaciones en un solo gen (herencia monogénica) ligada al cromosoma X o autosómica recesiva o dominante. Existe un tipo de neutropenia congénita leve, que se puede presentar con mayor frecuencia en individuos de ascendencia africana y de algunos grupos étnicos del Medio Oriente, la cual se conoce como neutropenia étnica, en este caso el límite inferior bajo que se puede considerar aceptable, en personas que no presentan evidencia de mayor riesgo de infecciones graves entre otros trastornos, debe ser ajustado a la baja considerando la etnia.

A continuación, se describirán diferentes neutropenias clasificadas como congénitas:

Neutropenia cíclica. Se caracteriza por neutropenias que presentan intermitencia, con intervalos de 21 días (variable). Es heredable, de carácter autosómico dominante, causada por mutaciones en el gen ELANE “Elastase, Neutrophil Expressed”. Este gen se sitúa en el brazo corto del cromosoma 19 que codifica para la proteína elastasa de los neutrófilos.

Neutropenia Congénita Grave. El síndrome de Kostmann o Neutropenia Congénita Grave, es un trastorno heredable autosómico recesivo, relacionado con mutaciones en el gen HAX1 y G6PC3. Lo anterior, resulta en una detención de la maduración de los neutrófilos en médula ósea. El defecto en la proteína mitocondrial HAX1 da como resultado una desregulación de la muerte celular programada de las células mieloides. El aumento de la apoptosis y la disminución en la expresión de proteínas antiapoptóticas Bcl-2 de “B-cell Lymphoma” y Bcl-xL de “B-cell Lymphoma-extra large”, genera alteraciones en la maduración de la granulopoyesis, lo que conlleva su detención en la etapa de promielocitos. Los pacientes con síndrome de Kostmann son susceptibles comúnmente a infecciones bacterianas, afectando predominantemente la boca y el recto, con desarrollo de abscesos que afectan a la piel y los tejidos blancos, furúnculos y llagas, además de otitis media, periodontitis y neumonía. Las mutaciones que afectan a las dos isoformas de HAX1 (A y B), se asocian adicionalmente a anomalías neurológicas y epilepsia.

Neutropenia asociada a otras enfermedades o síndromes. En este caso la neutropenia es una manifestación producto de patologías genéticas o síndro-

mes, que puede ser evidente desde el momento del diagnóstico o en la medida que la complejidad de la enfermedad evolucione. Un ejemplo, es la neutropenia asociada al síndrome de Shwachman-Diamond, el cual es heredable, de carácter autosómico recesivo y en el 90% de los casos se encuentra asociado a mutaciones en el gen SBDS de "Shwachman-Bodian-Diamond Syndrome" en el cromosoma 7. Se presenta con tres trastornos importantes: disfunción pancreática exocrina, anomalías esqueléticas y disfunción de la médula ósea. Debido a la disfunción de la médula ósea, los individuos con síndrome de Shwachman-Diamond cursan con alteraciones cuantitativas de las células hematopoyéticas, siendo la neutropenia la alteración sanguínea más frecuente, por lo que existe un riesgo mayor de infecciones bacterianas. En tabla 25-2 se mencionan los tipos de neutropenias congénitas.

Tabla 25-2. Clasificación Neutropenias Congénitas.

Clasificación	Factores desencadenantes
Neutropenia cíclica	Mutaciones en el gen ELANE, carácter autosómico dominante.
Neutropenia Congénita Grave o Síndrome de Kostmann	Mutaciones en el gen HAX1 y G6PC3, carácter autosómico recesivo.
Neutropenia asociada a otras enfermedades o síndromes	Manifestación producto de patologías genéticas o síndromes, dependiente de la evolución clínica. Ejemplo: neutropenia asociada al síndrome de Shwachman-Diamond.

3.1.2 Neutropenias adquiridas

Dentro de este tipo de neutropenias se encuentran las que se desencadenan por infecciones o neutropenia postinfecciosa, las provocadas por ciertos fármacos, las neutropenias originadas por activación del complemento, las que involucran un trastorno inmunológico, la neutropenia idiopática crónica, las neutropenias por hiperesplenismo, aquellas neutropenias por deficiencias nutricionales de vitamina B12 o folato y neutropenias desencadenadas por enfermedades que afectan a la médula ósea. Con respecto a las neutropenias inmunomediadas, es importante destacar que los recuentos bajos de neutrófilos se deben a destrucción periférica de estos glóbulos blancos debido a la acción de anticuerpos con especificidad frente a antígenos de su membrana celular, las cuales incluyen variadas afecciones como las neutropenias aloinmunes y las neutropenias autoinmunes verdaderas, que pueden estar asociadas a patologías autoinmunes (ejemplo: Lupus Eritematoso Sistémico y Síndrome de Sjögren), o aquellas neutropenias autoinmunes que no se asocian a otras patologías (por autoanticuerpos de neutrófilos).

3.2. Otras leucopenias

El descenso del número de eosinófilos circulantes o **eosinopenia**, generalmente es marcador de inflamación aguda. A su vez está asociado a la enfermedad de Cushing y puede reflejarse en respuestas al estrés físico (traumatismos, cirugía, shock, entre otros) o por estrés emocional, debido al aumento en la producción de cortisol, por lo que los corticoesteroides también pueden desencadenarla. La **basopenia**, correspondiente a la disminución de basófilos en sangre periférica se relaciona fisiológicamente con periodos de ovulación y al embarazo. Además, puede estar presente en fenómenos de hipertiroidismo como la enfermedad de Graves y asociado a tratamientos por periodos prolongados con corticoesteroides. La **linfopenia** o disminución de los linfocitos en sangre periférica, puede desencadenarse por neoplasias e inmunodeficiencias, o por destrucción farmacológica de estos glóbulos blancos. Es importante destacar que el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), infecta principalmente a linfocitos T "helper" (CD4+), por lo que un recuento notablemente bajo de linfocitos es una problemática fundamental en pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), por lo que uno de los objetivos inmunológicos de la terapia antirretroviral es restituir cuantitativa y cualitativamente este tipo de linfocitos. La **monocitopenia** es un evento raro, sin embargo, puede ser notoria en individuos que padecen anemia aplásica o en leucemia de células peludas, producto de la pancitopenia característica de estas enfermedades. Además, el trastorno genético denominado monocitopenia con susceptibilidad a infecciones o síndrome MonoMAC es causado por mutaciones en el gen GATA2, con herencia autosómica dominante o esporádica, el cual origina monocitopenia, deficiencia de células B y de células "Natural Killer" con un aumento en la susceptibilidad a infecciones oportunistas por micobacterias atípicas, hongos, virus y bacterias, a su vez con una estrecha relación en pacientes diagnosticados con síndrome mielodisplásico o leucemia mieloide aguda.

4. LECTURAS SUGERIDAS

Abramson N, Melton B. Leukocytosis: basics of clinical assessment. Am Fam Physician. 2000 Nov 1;62(9):2053-60.

Capsoni, F., Sarzi-Puttini, P., & Zanella, A. (2005). Primary and secondary autoimmune neutropenia. Arthritis research & therapy, 7(5), 208–214.

Dale, D.C. (2017), How I manage children with neutropenia. Br J Haematol, 178: 351-363.

Lyu, B., Lyu, W., & Zhang, X. (2020). Kostmann Syndrome With Neurological Abnormalities: A Case Report and Literature Review. Frontiers in pediatrics, 8, 586859.

Raskin, R. E., Latimer, K. S., & Tvedten, H. (2004). Leukocyte Disorders. Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods, 63–91.

Capítulo

26

LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA

María José García R.

Resumen
1. **Introducción**
2. **Concepto e Incidencia**
3. **Patogénesis y Fisiopatología**
4. **Clínica y Examen Físico**
5. **Pruebas Complementarias**
6. **Diagnóstico y Clasificación**
7. **Factores Pronóstico**
8. **Tratamiento**
   - 8.1. Objetivos del tratamiento
   - 8.2 Fármacos
9. **Seguimiento**
10. **Lecturas sugeridas**

RESUMEN

La leucemia mieloide crónica es una enfermedad mieloproliferativa crónica que tiene su origen en la célula madre pluripotencial en la que una alteración genética adquirida, la translocación entre los cromosomas 9 y 22, que resulta en el cromosoma Philadelphia, codifica la síntesis de una proteína de fusión BCR-ABL con actividad tirosincinasa aumentada en forma constitutiva, que condiciona una intensa proliferación granulocítica, con leucocitosis marcada sin pérdida de la capacidad madurativa.

Constituye el 15% del total de las leucemias, con una incidencia de aproximadamente 1 caso nuevo por 100000 habitantes y año, con una mediana de presentación al diagnóstico de 64 años y una ligera predilección por el sexo masculino.

En casi la mitad de los pacientes el diagnóstico se establece en forma casual, y el 90-95% de los pacientes se encontrarán en fase crónica. Cuando aparecen síntomas, lo más frecuente es que estos estén relacionados con la anemia y esplenomegalia que es común a casi todos los pacientes.

La alteración más frecuente al hemograma y que debe determinar el diagnóstico de sospecha es la hiperleucocitosis con desviación izquierda sin exceso de blastos junto con anemia moderada, trombocitosis leve y basofilia. La confirmación diagnóstica vendrá por la demostración de la t(9;22)(q34;q11) que resulta en la formación del cromosoma Philadelphia que contiene el gen de fusión BCR-ABL. La detección del cromosoma Ph y/o BCR-ABL1 con las técnicas genéticas rutinarias es esencial tanto al diagnóstico como en el seguimiento para evaluar la respuesta al tratamiento.

El pronóstico del paciente viene determinado fundamentalmente por la fase en la que se encuentra al momento del diagnóstico, aunque otros factores como el tamaño del bazo y el porcentaje de basófilos, permiten calcular la probabilidad de no alcanzar respuesta citogenética completa a los 18 meses, marcador de supervivencia libre de progresión.

La incorporación de los inhibidores de tirosincinasa ha tenido un profundo impacto en el pronóstico de estos pacientes, siendo actualmente la mortalidad anual de un 1-2% y la supervivencia global a 5 años superior al 90%. Por tanto, nuestra principal preocupación debe ser optimizar la calidad de vida de estos pacientes. En ese sentido, el objetivo del tratamiento debe ser obtener una respuesta molecular profunda lo antes posible para plantear la posibilidad de suspensión de terapia.

1. INTRODUCCIÓN

Fue en el año 1845 cuando Bennet y Virchow reconocen por primera vez como unidad diagnóstica la combinación de esplenomegalia con anemia severa e hiperleucocitosis ("*Weisses blut und leukämie*"). En 1878, Neumann describe el origen de la leucemia en la médula ósea. En 1960, Nowell y Hungerford describen, en la ciudad de Philadelphia, la pérdida de parte del brazo largo del cromosoma 22 en dos pacientes con leucocitosis marcada y esplenomegalia. Posteriormente, Rowley identificaría la translocación (9; 22), convirtiendo a la Leucemia Mieloide Crónica en la primera neoplasia con un verdadero biomarcador diagnóstico.

Fueron necesarias cuatro décadas para la aprobación de Imatinib, convirtiéndose en el primer fármaco dirigido a una diana molecular, cambiando por completo el pronóstico de estos pacientes y su expectativa de vida. A este inhibidor de tirosincinasa le seguirán posteriormente otros de segunda y tercera generación, consiguiendo bajar la mortalidad anual de un 10-20% a un 1-2%, con una supervivencia global a 5 años superior al 90% actualmente, lo que ha condicionado el aumento de su prevalencia a nivel mundial.

Si bien el Alotransplante de Precursores Hematopoyéticos se sigue considerando la única alternativa curativa para estos pacientes, la eficacia y nivel de seguridad de los inhibidores de tirosincinasa lo han desplazado en forma considerable, estando actualmente indicado solo en pacientes muy seleccionados. Por otro lado, en los últimos años, se han publicado múltiples estudios acerca de la posibilidad de remisión libre de terapia, lo cual se ha convertido en el principal objetivo del tratamiento en estos pacientes y ha modificado nuestra visión y manejo de la enfermedad.

2. CONCEPTO E INCIDENCIA

La leucemia mieloide crónica (LMC) es un tipo de neoplasia mieloproliferativa crónica según la clasificación vigente de la Organización Mundial de la Salud (OMS 2016) que tiene su origen en la célula madre pluripotencial o stem cell, en la que se identifica una alteración genética adquirida, cromosoma Philadelphia y que se caracteriza por una intensa hiperplasia granulocítica con leucocitosis marcada sin pérdida de la capacidad madurativa.

En EEUU la incidencia anual es de aproximadamente 2.5 casos por 100.000 habitantes. Representa un 15% del total de las leucemias y es ligeramente más frecuente en hombres que en mujeres (1.3: 1). En Chile no hay registros oficiales pero se estima una incidencia de 1/100.000hab/a, similar a la descrita en la población europea (0.7-1.9 según país). La mediana de edad en el momento del diagnóstico es de 64 años. La causa de la translocación genética se desconoce, aunque se ha identificado la exposición previa a radiaciones ionizantes como posible factor de riesgo para su desarrollo.

3. PATOGÉNESIS Y FISIOPATOLOGÍA

La LMC se produce como consecuencia de una alteración genética adquirida que afecta al stem cell, la translocación recíproca entre los brazos largos de los cromosomas 9 y 22 que se conoce como cromosoma Philadelphia (Phi+). Esta anomalía citogenética (t(9;22)(q34;q11)) implica la translocación de la región ABL del cromosoma 9 que se fusiona con la región BCR del cromosoma 22. El punto de rotura de ABL es constante, pero el de BCR varía, dando lugar a los diferentes transcritos. Dependiendo del punto de quiebre, la proteína de fusión será de mayor o menor tamaño. La más frecuente es la p210, seguida de la p190 y p230. La proteína codificada es una proteína oncogénica con actividad tirosina kinasa aumentada que altera las vías de proliferación y supervivencia celular. En más del 95% de los pacientes con LMC se puede demostrar la fusión del gen BCR-ABL.

La proteína p210 es una proteína cinasa con un tamaño de 210 kD que está activada en forma constitutiva y que actúa fosforilando varios sustratos, entre los que se incluyen distintos factores de regulación del ciclo celular, favoreciendo la proliferación celular, inhibiendo el proceso de apoptosis, y por tanto, aumentando la supervivencia celular.

4. CLÍNICA Y EXAMEN FÍSICO

Aproximadamente el 40-50% de los pacientes se encuentran asintomáticos en el momento del diagnóstico, dado la fase indolente que suele caracterizar a esta enfermedad en su etapa inicial, siendo habitual el hallazgo casual de un hemograma sugerente en exámenes de rutina. La enfermedad puede clasificarse en tres fases clínicas: fase crónica (FC), fase acelerada (FA) y crisis blástica (CB). En torno al 90-95% de los pacientes se diagnostican en FC; de los sintomáticos, lo más frecuente es encontrar síntomas derivados de la anemia (70%) y la esplenomegalia (50%) que suele caracterizar a estos pacientes. Los síntomas más frecuentes son fatigabilidad, malestar general, bajada de peso, dolor en hipocondrio izquierdo y plenitud postpandrial. Los fenómenos tromboembólicos y las manifestaciones hemorrágicas son raras, al igual que los síntomas de leucostasis (sensación disneica, somnolencia, confusión), dado que la leucocitosis es a expensas de células maduras. La hepatomegalia es mucho menos frecuente que la esplenomegalia (<10%), al igual que la palpación de adenopatías y la infiltración de la piel y otros tejidos. En caso que aparezcan, debe sospecharse que el paciente se encuentra en FA o CB. En estas fases también suele ser frecuente el dolor óseo, la fiebre y el sangrado.

5. PRUEBAS COMPLEMENTARIAS

En el hemograma destaca, como forma más habitual de presentación de la LMC en FC, una leucocitosis marcada con desviación izquierda y basofilia, con anemia en grado variable y trombocitosis moderada. La mediana de leucocitos al diagnóstico es de 100.000, en general con menos de un 2% de blastos. La basofilia

suele estar presente en la totalidad de los casos y la eosinofilia en aproximadamente el 90%. La monocitosis es característica de la variante p190 BCR-ABL y la neutrofilia con menos desviación izquierda, de la variante p230 BCR-ABL. En caso de trombocitopenia, debemos sospechar FA/CB u otra patología. También es frecuente encontrar LDH aumentada, junto con hiperuricemia e hiperpotasemia, en relación con hipermetabolismo celular, así como aumento de los niveles de vitamina B12 hasta 10 veces por encima de su valor normal como consecuencia del aumento de sus proteínas transportadoras (transcobalamina I y II).

Al mielograma destaca aumento de la celularidad a expensas de una panmielosis, con predominio de la hiperplasia de la serie granulocítica. Su realización es fundamental para el conteo de blastos, lo que permitirá definir la fase en la que se encuentra la enfermedad. El análisis por citometría de flujo se reserva para los casos con sospecha de FA o CB, para una mejor caracterización de las células inmaduras, lo cual es fundamental para el seguimiento y evaluación de respuesta al tratamiento. La biopsia de médula ósea no es obligatoria al diagnóstico, salvo que la forma de presentación no sea la habitual y sea necesario establecer diagnóstico diferencial con otros síndromes mielodisplásicos/mieloproliferativos crónicos, permite identificar el grado de fibrosis asociada, que en general será leve.

La citogenética convencional o cariotipo consiste en el estudio de la morfología de los cromosomas teñidos con bandas y permite analizar tanto las alteraciones numéricas como las estructurales en las metafases de las células tumorales. Su principal limitación es que se requieren al menos 20 metafases para que el análisis sea adecuado. Existe otra técnica de análisis citogenético mediante hibridación in situ fluorescente (FISH) en la que se emplean sondas locus específicas que permiten detectar el 100% de las fusiones BCR-ABL, aunque no se identifica el tipo de transcrito. La técnica FISH resulta de gran utilidad cuando el cariotipo no es concluyente por falta de células en división o en caso de translocación críptica, lo cual puede ocurrir hasta en un 5-10% de los casos.

Mediante RT-PCR (Prueba de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa) cualitativa y/o cuantitativa, podemos identificar y/o medir el gen de fusión BCR-ABL. Esta prueba amplifica fragmentos de ARN, para que sea más fácil detectarlos y cuantificarlos. De este modo, la anomalía BCR-ABL puede detectarse incluso cuando está presente en un número muy bajo de células, lo que permite una adecuada monitorización de la respuesta al tratamiento. Es recomendable identificar la isoforma molecular del gen de fusión al momento del diagnóstico para una correcta monitorización de la respuesta molecular, y además evitar posibles falsos negativos. El estudio cuantitativo permite medir los transcritos BCR-ABL1 respecto de un gen control (ABL). Utiliza sondas y primers específicos y puede realizarse tanto en sangre periférica como en médula ósea. El resultado se expresa como porcentaje de copias detectadas sobre el gen control, que es estandarizado a una escala internacional mediante un factor de conversión específico de cada laboratorio, lo cual permite obtener resultados comparables en los distintos laboratorios distribuídos a nivel mundial.

6. DIAGNÓSTICO Y CLASIFICACIÓN

El diagnóstico de sospecha se basa en el hallazgo en el hemograma de leucocitosis marcada con desviación izquierda, sin exceso de blastos y basofilia, con anemia en grado variable y trombocitosis moderada junto con esplenomegalia al examen físico y una historia clínica sugerente. La confirmación diagnóstica precisa de la demostración de la t(9; 22) o cromosoma Philadelphia mediante técnicas de citogenética, o del reordenamiento BCR-ABL1 mediante técnica de RT-PCR.

Según los criterios de la OMS, podemos clasificar la LMC en:
- fase acelerada (FA), definida por la presencia de uno o más de los siguientes criterios: 10-19% de blastos en sangre periférica o médula ósea; ≥20% de basófilos en sangre periférica; recuento plaquetario <100.000/µL sin relación con tratamiento; recuento plaquetario >1.000.000/µL que no responde al tratamiento; aparición de alteraciones citogenéticas adicionales durante el tratamiento; y/o, aumento del recuento de leucocitos o del tamaño del bazo durante el tratamiento.
- crisis blástica CB), definida por al menos uno de los siguientes: ≥20% de blastos en sangre periférica o en médula ósea; presencia de clusters de blastos en médula ósea; y/o, presencia de infiltrado extramedular de blastos (sarcoma mieloide).
- fase crónica (FC), aquellos pacientes que no cumplen criterios de diagnóstico para las otras fases. Como decíamos antes, es la forma en la que se presentan aproximadamente el 95% de los pacientes, los cuales en general alcanzan buenas tasas de respuesta con ITK con supervivencia global a 5 años superior al 90% y con indicación de terapias intensivas como el Alotransplante de precursores hematopoyéticos solo en casos muy seleccionados

7. FACTORES PRONÓSTICO

El principal factor pronóstico de la enfermedad viene determinado por la fase en la se encuentra el paciente al momento del diagnóstico. En los pacientes en FC, los factores considerados de valor pronóstico son:
- edad avanzada
- recuento de basófilos y eosinófilos
- grado de esplenomegalia al examen físico
- % de blastos en sangre periférica
- recuento plaquetario

Los índices de Sokal y Hasford fueron desarrollados en la era previa a la incorporación de los ITK, pero han demostrado su utilidad en pacientes tratados con Imatinib como predictores de riesgo de progresión. El índice EUTOS, desarrollado en la época de los ITK y con una fórmula más sencilla para su cálculo, predice la probabilidad de no alcanzar respuesta citogenética completa (CCyR) a los 18 meses (marcador de supervivencia libre de progresión), que será de aproximadamente un 34% para los pacientes de alto riesgo. Los paneles de

expertos recomiendan también el cálculo del índice ELTS, que es un predictor de supervivencia.

8. TRATAMIENTO

8.1. Objetivos del tratamiento

El tratamiento de los pacientes con LMC se basa en el cumplimiento de distintos objetivos dentro de unos plazos previamente establecidos. Todo ello determina que la monitorización esté estandarizada y las decisiones terapéuticas guiadas por estos resultados.

El primer objetivo a alcanzar es respuesta hematológica completa:
- Normalización del hemograma
- Desaparición de los síntomas atribuibles a la enfermedad
- Corrección de la esplenomegalia

La evaluación de la respuesta citogenética se basa en el análisis por cariotipo del porcentaje de expresión del cromosoma Philadelphia (Phi +):
- Completa: cariotipo normal, ninguna metafase con expresión de Phi+
- Parcial: 1-35% metafases Phi +
- Menor: 36-65% metafases Phi +
- Mínima: 66-95% metafases Phi +
- Sin respuesta citogenética: > 95% metafases Phi +

La evaluación de la respuesta molecular se realiza mediante la medición de la proporción de los transcritos de BCR-ABL ajustada a una Escala Internacional. Se expresa en % de BCR-ABL en una escala logarítmica, donde el 10%, 1%, 0,1%, 0,01%, 0,0032% y 0,001% corresponden a una disminución de 1, 2, 3, 4, 4.5 y 5 logaritmos respectivamente.
- Respuesta Molecular Mayor (RMM): ratio ≤0.1%
- Respuesta Molecular Completa (RMC): ausencia de detección de ARNm BCR-ABL mediante técnica de RT-PCR cuantitativa
- Respuesta Molecular 4: ratio ≤0.01%; y/o BCR-ABL es indetectable y el número de copias de ABL estudiadas es ≥ 10000 o el número de copias de ß-glucuronidasa (GUSB) estudiadas es ≥24.000
- Respuesta Molecular 4.5: ratio ≤0.0032%; y/o BCR-ABL es indetectable y el número de copias de ABL estudiadas es ≥ 32000 o el número de copias de GUSB estudiadas es ≥77000
- Respuesta Molecular 5: ratio ≤0.001%; y/o BCR-ABL es indetectable y el número de copias de ABL estudiadas es ≥ 100000 o el número de copias de GUSB estudiadas es ≥240000

Los plazos en los que se deben alcanzar los distintos grados de respuesta son:
- Respuesta hematológica completa:
  - óptimo : al mes
  - fallo : si no se produce a los 3 meses

- Respuesta citogenética completa:
  - óptimo : a los 6 meses
  - fallo : si no se alcanza a los 12 meses
- Respuesta molecular mayor:
  - óptimo : a los 12 meses
  - falla : ratio>1% a los 18 meses

El fallo obliga a la reevaluación completa del paciente (adherencia a tratamiento, interacciones medicamentosas, alteraciones citogenéticas adquiridas, evolución clonal y/o mecanismos de resistencia) y consideración de cambio de tratamiento.

En los últimos años se ha sumado un nuevo hito en el manejo de los pacientes con LMC: llevar al paciente a suspensión de terapia manteniéndolo en remisión (TRF por sus siglas en inglés). Varios estudios han demostrado que aproximadamente el 50% de los pacientes que alcanzan respuesta molecular profunda mantenida por al menos 2 años y suspenden terapia, mantienen dicha respuesta. Por otro lado, la inmensa mayoría de los pacientes que experimentaron una pérdida de respuesta la recuperaron tras reintroducir el tratamiento. En este sentido, han sido varios los grupos que han publicado recomendaciones para la discontinuación de terapia en la práctica clínica habitual, aunque aún no existe consenso al respecto, ni tampoco recomendaciones locales. La mayoría de expertos recomiendan que para considerar suspensión de terapia el paciente debe haber estado siempre en fase crónica, en tratamiento con ITK por al menos 3 años y con respuesta molecular profunda durante al menos un año. Una vez suspendido el ITK, debe hacerse una monitorización frecuente de la respuesta molecular mediante RT-PCR cuantitativa, ojalá mensual durante el primer año.

8.2. Fármacos

El tratamiento de elección de los pacientes con LMC en fase crónica son los ITK, a excepción de las mujeres embarazadas, que deberán tratarse con interferón. Los ITK bloquean la activación de BCR-ABL de forma que inducen la apoptosis de las células que expresan la mutación.

El primer ITK que fue aprobado para el tratamiento de la LMC fue Imatinib. Posteriormente aparecieron nilotinib y dasatinib, ITK de segunda generación que demostraron ser más potentes que Imatinib, consiguiendo respuestas moleculares más profundas en forma más rápida, sin embargo, esto no se correlaciona con un impacto favorable ni en la supervivencia global ni en la supervivencia libre de progresión, por lo que a pesar de estar aprobados en primera línea, su indicación quedaba limitada a pacientes de alto riesgo. Con la incorporación como objetivo de tratamiento de la remisión libre de terapia, el impacto de conseguir una respuesta molecular profunda lo antes posible es mucho mayor, lo que ha condicionado un cambio en el tratamiento en primera línea. El otro ITK

de segunda generación también aprobado en primera línea es bosutinib. Ponatinib, ITK de tercera generación, solo está aprobado en segunda línea.

Imatinib. Fue el primer ITK en aprobarse. La dosis recomendada en fase crónica es 400mg/día, se recomienda que se tome con las comidas. La tasa de RCC a los 12 meses fue de un 68% (49-77 %) y la de RMM de un 34% (18%- 58%), sin embargo, a 5 años, la tasa de RMM sube hasta un 60-80%. La supervivencia libre de progresión y la supervivencia global a 5 años es superior al 90%. La intolerancia al medicamento es frecuente, de forma que en algunas series se describen hasta un 50% de pacientes que tuvieron que cambiar de ITK a 5 años. Los principales efectos secundarios descritos son retención de líquidos, alteraciones gastrointestinales, calambres musculares, dolor articular, rash cutáneo y fatigabilidad.

Dasatinib. La dosis recomendada en fase crónica es 100mg/d. El estudio DASISION comparó dasatinib con imatinib en primera línea, demostrando el primero tasas de RCC significativamente superiores, lo mismo ocurrió con la RMM. La supervivencia global y la supervivencia libre de progresión a 5 años no mostraron diferencias significativas. El perfil de tolerancia es similar a Imatinib. Dentro de los efectos secundarios a tener en cuenta está el riesgo aumentado de derrame pleural.

Nilotinib. La dosis recomendada es 300mg/12h y debe tomarse alejado de las comidas. El estudio ENESTnd comparó nilotinib frente a imatinib en primera línea. Nilotinib demostró ser superior en la tasa de RCC y de RMM. Dentro de los efectos secundarios, hay un mayor riesgo de eventos cardiovasculares y pancreatitis.

Bosutinib. La dosis recomendada es de 400mg/d en primera línea y 500mg/d en segunda, debe tomarse con las comidas. Su principal limitación es la diarrea.

Ponatinib. La dosis recomendada es 45mg/d. Es el único ITK eficaz para la mutación T315I. La principal limitación en su uso son las complicaciones cardiovasculares.

Alotransplante de Precursores Hematopoyéticos (AloTPH). El avance que supuso la introducción de los ITK en el tratamiento de los pacientes con LMC cambió la historia natural de esta enfermedad. En espera de mayor seguimiento de los estudios de suspensión de terapia, el AloTPH, sigue siendo a fecha de hoy, la única terapia con capacidad curativa, sin embargo, dado la morbimortalidad asociada a procedimiento, solo debe considerarse esta opción en pacientes refractarios o intolerantes a todos los ITK disponibles; y en pacientes en FA o CB, como tratamiento de consolidación tras alcanzar remisión completa post quimioterapia.

9. SEGUIMIENTO

Se recomienda hemograma cada 2 semanas hasta alcanzar respuesta hematológica completa y estudio molecular cada 3 meses hasta respuesta molecular

mayor, después de esto, debe hacerse al menos cada 6 meses. Si no había alteraciones citogenéticas adicionales al diagnóstico y la ratio disminuye en forma progresiva, no sería estrictamente necesario repetir cariotipo, aunque las guías clínicas siguen recomendando que este se repita a los seis meses para confirmar la respuesta citogenética completa. En todos y cada uno de los controles es importante evaluar la adherencia al tratamiento, como posible causa de respuesta subóptima o falla del tratamiento, así como la posibilidad de interacciones medicamentosas. En este sentido, por la frecuencia con la que suele producirse concomitancia en el tratamiento, es importante destacar el rol de los inhibidores de la bomba de protones, que aumentan el pH gástrico y pueden disminuir la solubilidad y biodisponibilidad de los ITK que son bases débiles. Esto es especialmente relevante para dasatinib y bosutinib.

10. LECTURAS SUGERIDAS

Goldman et al. Tyrosine-kinase inhibition in treatment of chronic myeloid leukaemia. Lancet 2000;355(9209):1031-1032.

Bennour et al. Chronic myeloid leukemia: Relevance of cytogenetic and molecular assays. Crit Rev Oncol Hematol 2016; 97: 263-74.

Falchi et al. Significance of deeper molecular responses in patients with chronic myeloid leukemia in early chronic phase treated with tyrosine kinase inhibitors. Am J Hematol. 2013;88(12):1024-1029.

Hochhaus et al. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. Leukemia. 2020;34(4):966-984.

Mahon et al. Deep molecular response in chronic myeloid leukemia: the new goal of therapy? Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res. 2014;20(2):310-322.

Mahon et al. Discontinuation of TKI therapy and 'functional' cure for CML. Best Pract Res Clin Haematol. 2016;29:308-313.

Mahon et al. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. Lancet Oncol. 2010;11(11):1029-1035.

Haouala et al. Drug interactions with the tyrosine kinase inhibitors imatinib, dasatinib, and nilotinib. Blood. 2011;117(8):e75-87.

Guía Clínica para el diagnóstico y tratameinto de la Leucemia Mieloide Crónica, 2017. www.sochihem.cl

Capítulo

27

TROMBOCITOSIS PRIMARIA O ESENCIAL

Guillermo J. Ruiz Argüelles, Guillermo J. Ruiz Delgado y Guillermo Ruiz Reyes

RESUMEN

Los síndromes mieloproliferativos crónicos son un grupo de padecimientos clonales que suponen la producción desordenada y descontrolada de elementos de la serie mieloide, eritroide o trombocítica en la médula ósea. Todos estos padecimientos están relacionados entre sí, y también con la leucemia aguda mieloblástica, en la que puede culminar la evolución natural de cualquiera de estas entidades. La **Trombocitosis esencial o primaria** supone la producción desordenada de megacariocitos y plaquetas.

1. INTRODUCCIÓN

Las neoplasias mieloproliferativas (NMP) crónicas son patologías caracterizadas por mieloproliferación monoclonal que involucra linajes múltiples, que conservan un grado variable de maduración celular y que tienen el potencial para seguir una evolución clonal. Las NMP agudas corresponden a las leucemias agudas mieloblásticas. De manera simplista, se pueden reconocer, según la línea celular mayormente afectada, cuatro variedades de SMP crónicas: (a) Policitemia vera (PV), (b) Trombocitosis esencial (TE), (c) Leucemia granulocítica crónica/Leucemia Mieloide crónica (LGC/LMC) y (d) Mielofibrosis primaria (MF) La clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS 2008) organiza las neoplasias mieloproliferativas según se indica en la tabla 27-1.

Tabla 27-1. Clasificación de las neoplasias mieloproliferativas (OMS, 2008)

Leucemia granulocítica crónica
Leucemia neutrofílica crónica
Policitemia Vera
Mielofibrosis primaria
Trombocitosis primaria o esencial
Leucemia eosinofílica crónica
Mastocitosis
Neoplasia mieloproliferativa no clasificable
Neoplasia mieloide y linfoide asociada a eosinofilia
Asociada a reordenamientos en PDGFRA
Asociada a reordenamientos en PDGFRB
Asociada a reordenamientos en FGFR1

Estas neoplasias mieloproliferativas crónicas son de naturaleza clonal, primarias y no secundarias a un estímulo de tipo infeccioso u hormonal. Su patogenia es diferente de la de las leucoeritroblastosis reactivas (antes llamadas reaccio-

nes leucemoides) o de las eritrocitosis originadas, por ejemplo, por producción excesiva de eritropoyetina. El proceso proliferativo no está limitado en forma estricta a una sola línea hematopoyética, sino que incluye en mayor o menor proporción a varias líneas celulares. En la figura 27-1 se muestra la interrelación que existe entre todas las neoplasias mieloproliferativas (NMP) crónicas y las leucemias agudas mieloblásticas. Las diversas líneas celulares implicadas en las NMP derivan de un ancestro común indiferenciado o pluripotencial y no a la célula comprometida para producir eritrocitos, granulocitos o trombocitos; en este sentido las NMP deben considerarse como enfermedades malignas originados en las células pluripotenciales hematopoyéticas (CPH) o células troncales *(stem cells)*.

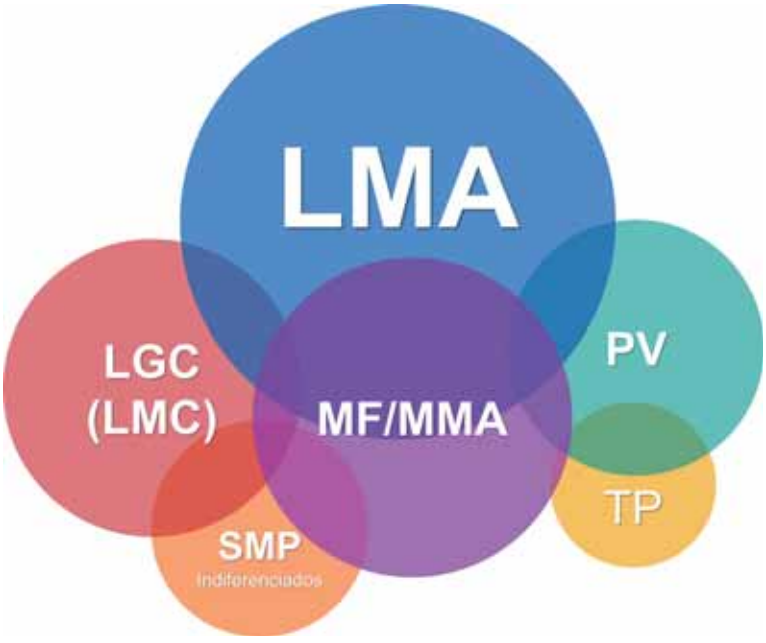


Figura 27-1. Interrelación de los Síndromes mieloproliferativos agudos como la leucemia mieloide aguda (LMA) con los síndromes mieloproliferativos crónicos. Leucemia granulocítica crónica (LGC; Leucemia mieloide crónica, LMC), policitemia vera (PV), trombocitosis primaria (TP), mielofibrosis con metaplasia mieloide agnogénica (MF/MMA) y síndromes mieloproliferativos (SMP) indiferenciados.

La trombocitosis primaria (TP) también ha recibido los nombres de trombocitemia primaria, trombocitemia esencial, hemorrágica o idiopática; el padecimiento es clonal y es el prototipo de la trombocitosis autónoma.

2. PATOGENIA

Son característicos de las TP la trombocitosis, el aumento de megacariocitos, el volumen megacariocítico total y el volumen medio megacariocítico. La produc-

ción de plaquetas puede ser incluso 15 veces mayor de lo normal. Se producen trombosis por el incremento del volumen plaquetario, aunado a una anormalidad cualitativa de las plaquetas que las hace hiperagregables. La TE, aunque es un padecimiento raro, en México es más frecuente que la PV.

3. DATOS CLÍNICOS

La TE es un padecimiento de la edad adulta, entre los 50 y 70 años, aunque puede observarse de los 21 a los 84 años de edad, siendo la mediana de la edad de presentación 61 años. Es ligeramente más frecuente en la mujer. El dato clínico más importante es la hemorragia y los síntomas que sugieren isquemia del sistema nervioso central e isquemia vascular periférica. Otros datos clínicos son: debilidad, cefalea, parestesias, mareos, alteraciones visuales y prurito. La manifestación vasoclusiva más característica es el síndrome de eritromelalgia en el que hay dolor localizado tipo quemadura, enrojecimiento y aumento de la temperatura en las porciones distales de las extremidades, que puede progresar a cianosis o necrosis de los dedos de pies o manos.

4. ESTUDIOS DE LABORATORIO

El dato sobresaliente es el incremento en el recuento plaquetario, ya que habitualmente las plaquetas pasan de 1000x103/µL; se han llegado a informar valores tan altos como 14.000x103/µL. Hay aumento de micro y de macroplaquetas, lo que refleja megacariocitopoyesis defectuosa. La leucocitosis casi nunca es mayor de 30x103/µL y la anemia es leve. La médula ósea es hipercelular, con acentuada hiperplasia megacariocítica. El cromosoma Philadelphia debe ser negativo. La mutacion de JAK2 se relaciona hasta en 65% de los casos de TE y se han descrito otras mutaciones como la mutación del gen CALR en 20 a 25% y MPL en 5%, ambas con consecuencias similares. En general, aproximadamente 90% de los casos tiene una mutación en JAK2, CALR o MPL que origina la proliferación exagerada de un clon megacariocítico.

5. DIAGNÓSTICO

En ocasiones, es difícil establecer un diagnóstico inequívoco de TE. De acuerdo con lo anterior, el diagnóstico de esta enfermedad es de exclusión y esto se logra si se cumplen los criterios que se indican en la tabla 27-1.

Tabla 27-1 Criterios diagnósticos de Trombocitosis esencial (OMS 2016)

Criterios mayores

1. Recuento plaquetario >450x103/µL
2. Biopsia de médula ósea con proliferación de megacariocitos maduros con núcleos hiperlobulados sin cambios en eritropoyesis y granulopoyesis.
3. No cumplir con criterios de la OMS para PV, MFP, LGC, SMD u otras neoplasias de línea mieloide.
4. Presencia de mutación JAK2, CALR o MPL.

Criterio menor

1. Presencia de marcadores clonales alternos o ausencia de trombocitosis reactiva.

Para el diagnostico se requiere cumplir con los cuatro criterios mayores o los primeros tres mayores y el criterio menor.

6. TRATAMIENTO

Los pacientes en que se diagnostica TP y presentan manifestaciones hemorrágicas o vasoclusivas deben tratarse inmediatamente con agentes mielosupresores para disminuir el recuento plaquetario y con antiplaquetarios. Si el sujeto está asintomático y tiene trombocitosis leve, la enfermedad puede seguir un curso benigno y no se requiere tratamiento.

Los pacientes con TE pueden catalogarse en alto o bajo riesgo; los siguientes datos se asocian con alto riesgo: historia de trombosis o hemorragia, edad mayor de 60 años, anemia y leucocitosis mayor de 15x103/µL y trombocitosis mayor de 1000x103/µL. Los pacientes de alto riesgo deben recibir mielosupresión, en tanto que aquellos con riesgo bajo pueden ser tratados con agentes antiplaquetarios como ácido acetilsalicílico. Es muy probable que el tratamiento de elección en TE en la actualidad sea la hidroxiurea. El anagrelide es muy útil también, es un fármaco que además de inhibir la adhesión y agregación plaquetaria, inhibe la trombopoyesis y es muy bien tolerado; su inconveniente es el costo alto. Otros mielosupresores como los alquilantes (melfalán, busulfán, etc.) pueden ser de utilidad. Si se requiere una reducción inmediata del recuento plaquetario, por ejemplo, en una hemorragia grave o antes de un procedimiento quirúrgico, debe efectuarse plaquetaféresis. El uso de agentes alquilantes produce la misma preocupación que en el caso de la PV, ya que pueden presentarse leucemia aguda y neoplasias gastrointestinales, sobre todo si se utilizan en forma continua. La esplenectomía está contraindicada en este padecimiento.

7. LECTURAS SUGERIDAS

Tefferi A , Pardanani A. Myeloproliferative Neoplasms: A Contemporary Review. JAMA Oncol2015 Apr;1(1):97-105.

Ruiz-Argüelles, G.J., Marín-López, A., LobatoMendizábal, E., Gamboa-Ojeda, I., SánchezAnzaldo, F.J. "El cromosoma Philadelphia lesiona la célula totipotencial: Trombocitosis primaria t (9q+22q-)". Rev Invest Clin (Méx) 1984; 36:49-51.

Ruiz-Argüelles, G.J., López-Martínez, B., Lobato-Mendizábal, E., Ruiz-Delgado, G.J. "An addition to geographic hematology: Chronic myeloproliferative diseases are infrequent in Mexican Mestizos". Int J Hematol, 2002, 75:499-502.

Ruiz-Argüelles Gj, Garcés-Eisele J, Ortiz-López, et al. Molecular caracterización of chronic myeloproliferative neoplasias in México. Hematology 2009; 14: 261-265.

Ruiz-Argüelles Gj, López-Martínez B, Lobato-Mendizabal E, Ruiz-Delgado Gj, An addition to geographic hematology: Chronic myeloproliferative diseases are infrequent in Mexican Mestizos. Int J. Hematol 2002;75:499-502.

Labastida-Mercado N, Galindo-Becerra S, Garcés-Eisele J, Colunga-Pedraza P, Guzman-Olvera V, Reyes-Nuñez V, Ruiz-Delgado GJ, Ruiz-Argüelles GJ. The mutation profile of JAK2, MPL and CALR in Mexican patients with Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. Hematol Oncol Stem Cell Ther. 2015 Mar;8(1):16-21. doi: 10.1016/j.hemonc.2014.12.002. Epub 2015 Jan 21.

Colunga-Pedraza PR, Gomez-Cruz GB, Colunga-Pedraza JE, Ruiz-Argüelles GJ. Geographic Hematology: Some Observations in Mexico. Acta Haematol. 2018;140(2):114-120. doi: 10.1159/000491989. Epub 2018 Sep 18. PMID: 30227427.

Talpaz, M., Kurzrock, R. et al. "Recent advances in the therapy of chronic myelogenous leukemia". Important Adv Oncol 1988; 297-321.

Tefferi, A. "Chronic myeloid disorders: Classification and treatment overview". Sem Hematol 2001;38(Suppl 2):1-4.

Tefferi, A., Silverstein, M.N. "Myeloproliferative disorders and Myelodysplastic Syndromes". In Hematology 1997, Education Program, American Society of Hematology. San Diego, CA. December 5-9, 1997;166-176.

Capítulo

28

POLICITEMIA VERA

Guillermo J. Ruiz Argüelles, Guillermo J. Ruiz Delgado y Guillermo Ruiz Reyes

RESUMEN

Las neoplasias mieloproliferativas crónicas son un grupo de padecimientos clonales que suponen la producción desordenada y descontrolada de elementos de la serie mieloide, eritroide o trombocítica en la médula ósea. Todos estos padecimientos están relacionados entre sí, y también con la leucemia aguda mieloblástica. La Policitemia Vera se caracteriza por producción aumentada de células eritroides, mieloides y megacariocitos.

1. INTRODUCCIÓN

Las neoplasias mieloproliferativas (NMP) crónicas son patologías caracterizadas por mieloproliferación monoclonal que involucra linajes múltiples, que conservan un grado variable de maduración celular y que tienen el potencial para seguir una evolución clonal. Las NMP agudas corresponden a las leucemias agudas mieloblásticas. De manera simplista, se pueden reconocer, según la línea celular mayormente afectada, cuatro variedades de SMP crónicas: (a) Policitemia vera (PV), (b) Trombocitosis esencial (TE), (c) Leucemia granulocítica crónica/Leucemia Mieloide crónica (LGC/LMC) y (d) Mielofibrosis primaria (MF) La clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS 2008) organiza las neoplasias mieloproliferativas según se indica en la tabla 27-1 (ver capítulo 27).

Estas neoplasias mieloproliferativas crónicas son de naturaleza clonal, primarias y no secundarias a un estímulo de tipo infeccioso u hormonal. Su patogenia es diferente de la de las leucoeritroblastosis reactivas (antes llamadas reacciones leucemoides) o de las eritrocitosis originadas, por ejemplo, por producción excesiva de eritropoyetina. El proceso proliferativo no está limitado en forma estricta a una sola línea hematopoyética, sino que incluye en mayor o menor proporción a varias líneas celulares. En la figura 27-1 (ver capítulo 27) se muestra la interrelación que existe entre todas las neoplasias mieloproliferativas (NMP) crónicas y las leucemias agudas mieloblásticas. Las diversas líneas celulares implicadas en las NMP derivan de un ancestro común indiferenciado o pluripotencial y no de la célula comprometida para producir eritrocitos, granulocitos o trombocitos; en este sentido las NMP deben considerarse como enfermedades malignas originadas en las células pluripotenciales hematopoyéticas (CPH) o células troncales *(stem cells).*

La policitemia vera (PV), también llamada policitemia rubra vera o panmielosis, es una entidad proliferativa de la CPH, de inicio insidioso, curso crónico y causa desconocida. Está caracterizada por la proliferación excesiva y sostenida de células eritroides, granulocíticas y megacariocíticas en la médula ósea. La médula ósea es hiperplásica y su crecimiento no es secundario a ningún estímulo medular reconocido. La PV es una enfermedad clonal que se origina en la CPH; aproximadamente 25% de los sujetos con PV tiene una anormalidad cromosómica reproducible y ha sido posible demostrar en algunos enfermos la presen-

cia constante de esta anormalidad en las células de las líneas hemopoyéticas mayores pero no en los tejidos no hemopoyéticos.

2. PATOGENIA

La anormalidad fundamental es la hiperplasia de los precursores de glóbulos rojos, granulocitos y plaquetas en la médula ósea; como resultado de ello, hay producción excesiva de estas células y por tanto, aumento de su número en la sangre periférica. La sobreproducción de glóbulos rojos incrementa su cifra total en el cuerpo, de manera que el volumen eritrocítico está aumentado.

3. EPIDEMIOLOGÍA

La incidencia es de alrededor de 1.9 por cada 100 000 personas por año y ocurre de manera más usual en hombres: 2.8 contra 1.3 casos por 100 000 personas por año. La PV es un padecimiento raro en algunas poblaciones como la mexicana; los escasos pacientes que hay tienen ancestros extranjeros, casi siempre caucásicos. Esto es confirmado por Ruiz-Argüelles y colaboradores quienes encontraron solamente 3 casos en una población de 8069 pacientes estudiados de junio de 1983 a marzo de 2001, lo que representa el 0.37%

4. DATOS CLÍNICOS

La PV es una enfermedad con numerosas manifestaciones. Los datos clínicos pueden relacionarse con las anormalidades cuantitativas o cualitativas de alguna de las tres series: roja, mieloide y plaquetaria. Es posible atribuir los síntomas y signos en gran parte al aumento de espacio vascular y volumen sanguíneo y a la lentitud del flujo de la sangre como resultado del aumento de la viscosidad de esta. La PV es una entidad de las edades media y adulta; la mayoría de los casos se presenta entre los 40 y 70 años, con inicio más frecuente alrededor de los 50 años. Los varones padecen la entidad un poco más que las mujeres. Los síntomas son causados, principalmente, por el volumen sanguíneo aumentado y por las complicaciones trombóticas y hemorrágicas. El inicio puede ser insidioso y en ocasiones el diagnóstico se sospecha cuando el citometría hemática muestra hematocrito elevado. En algunos casos, el padecimiento solo se diagnostica luego de que ocurre una complicación notable como hemorragia o trombosis. Los síntomas son inespecíficos y pueden referirse a cualquier órgano o sistema. La mayoría se relaciona con alteraciones circulatorias que resultan del aumento del volumen eritrocitario (VE). La hipervolemia e hiperviscosidad resultantes causan distensión vascular, alteración en el flujo sanguíneo e hipoxia tisular. La cefalea y los mareos son quejas frecuentes; también se presentan síncope, pérdida de memoria, incapacidad para concentrarse e irritabilidad. Los procesos vasculares cerebrales constituyen complicaciones importantes y pueden ser causa de muerte. Los síntomas cardiovasculares son habituales, siendo la disnea el más común. Los síntomas gastrointestinales son frecuentes: plenitud, sed, meteorismo y estreñimiento, además de úlcera péptica, hemorragia y trombosis. El dolor abdominal puede provenir de úlcera, crecimiento o infarto esplénico o bien

trombosis mesentérica. La esplenomegalia se presenta en dos terceras partes de los enfermos. Junto con la esplenomegalia, los datos más sobresalientes en la exploración física son color rojo de piel y membranas mucosas, congestión de vasos conjuntivales e ingurgitación de venas de la retina. El color rojo de piel y mucosas es un dato notable en la mayoría de los pacientes; es más prominente en la cara, especialmente en mejillas, oídos, labios y nariz pero también se nota en manos y pies, aunque en menor grado. La piel típicamente es de color rojo ladrillo, a menudo con un tinte cianótico que se marca más en la época de frío. Las complicaciones trombóticas se presentan en 30% de los enfermos y son causa importante de morbimortalidad.

5. ESTUDIOS DE LABORATORIO

El dato más importante de la PV es el aumento en el VE. Conforme la enfermedad avanza, van apareciendo anisocitosis y poiquilocitosis que llegan a ser muy acentuadas, junto con presencia de ovalocitos, eliptocitos y formas en lágrima. Un dato muy importante es que aparecen eritroblastos en circulación. La leucocitosis es frecuente en cifras de 12 a 20 x 103/µL pero ocasionalmente puede llegar a 50x103/µL. En la gran mayoría de los casos, la fosfatasa alcalina de los leucocitos está aumentada, al igual que el número de plaquetas, 500 a 1.000x103/µL; en ocasiones se han informado marcadas como 3.000 a 6.000 x103/µL. Se han encontrado anormalidades cromosómicas; las más frecuentes son deleción del brazo largo del cromosoma 5 (5q-), ganancia de un 8 ó 9 y deleción del brazo largo del 20. La vitamina B12 y la capacidad de fijación de la misma están aumentadas en muchos pacientes con PV no controlada. La necesidad de estudiar la médula ósea en la PV es controversial; algunos autores piensan que es determinante para efectuar el diagnóstico; otros dicen que no lo es. Casi siempre la médula ósea es hipercelular pero se ha informado como normal. Las tres series están hiperplásicas y reemplazan la grasa medular. Se han comunicado ligeros aumentos de reticulina o fibrosis o ambas.

La mutación en el gen JAK2 se presenta en el 98% de los casos de PV la cual origina un estado de proliferación y diferenciación continua, independiente e hipersensible a factores de crecimiento como la eritropoyetina. Los pacientes con dicha mutación son sensibles al tratamiento con inhibidores de JAK1-2 como el ruxolitinib.

6. DIAGNÓSTICO

En enfermos con valores elevados de las tres líneas celulares en sangre periférica, con esplenomegalia y sin datos que sugieran policitemia secundaria, es fácil hacer el diagnóstico de PV.

En la siguiente tabla se enumeran los criterios de las OMS 2016 para la PV.

TABLA 28-1. Criterios diagnósticos de policitemia vera (OMS, 2016)

Criterios mayores

1. En hombres: hemoglobina >16.5 g/dl o hematocrito >49%
   En mujeres: hemoglobina >16 g/dl o hematocritos >48%
   O
   Aumento de la masa eritrocitaria (25% por encima del valor predictivo normal)
2. Biopsia de médula ósea con hipercelularidad para la edad con crecimiento trilineal (panmielosis) con proliferación eritroide, granulocítica y megacariocítica marcada, y megacariocitosis pleomórficos maduros.
3. Presencia de mutaciones JAK2 del exón 12 o del JAK2V617F

Criterio menor

1. Eritropoyetina sérica por debajo de valores normales.
   Para el diagnóstico se requiere cumplir con los tres criterios mayores o con los primeros dos mayores y el criterio menor.

7. TRATAMIENTO

El objetivo de la terapéutica es reducir los volúmenes eritrocítico y sanguíneo por medios que: (a) tengan la menor posibilidad de dañar; (b) permitan la mayor supervivencia; (c) permitan una vida normal y (d) sean los menos costosos y no generen problemas al enfermo. Se han utilizado flebotomía, radiación y quimioterapia. Al momento del diagnóstico deben hacerse flebotomías para llevar los volúmenes eritrocítico y sanguíneo a lo normal lo más rápidamente posible, a fin de eliminar los síntomas del paciente. Se pueden efectuar flebotomías cada tres días hasta obtener hematocrito normal. Cuando hay trombocitosis grave, el mejor agente es anagrelide pero es caro. La hidroxiurea y el IFNα recombinante son también útiles en el tratamiento de los pacientes con PV y tienen menos efectos adversos que el fósforo radioactivo y el busulfán; ambos fármacos abaten las cuentas de eritrocitos, leucocitos y plaquetas. La hidroxiurea es mejor tolerada por los pacientes y más barata que el interferón. La esplenectomía puede ser útil en las etapas tardías de la enfermedad.

La administración de dosis bajas de ácido acetilsalicílico (100mg/dia) disminuye el número de eventos trombóticos y los síntomas de oclusión microvascular. El ruxolitinib es un inhibidor de JAK1-2 aprobado para pacientes con PV resistentes o intolerantes a hidroxiurea.

8. LECTURAS SUGERIDAS

Tefferi A, Pardanani A. Myeloproliferative Neoplasms: A Contemporary Review. JAMA Oncol 2015 Apr;1(1):97-105.

Ruiz-Argüelles, G.J., López-Martínez, B., Lobato-Mendizábal, E., Ruiz-Delgado, G.J. "An addition to geographic hematology: Chronic myeloproliferative diseases are infrequent in Mexican Mestizos". Int J Hematol, 2002, 75:499-502.

Ruiz-Argüelles Gj, Garcés-Eisele J, Ortiz-López, et al. Molecular caracterización of chronic myeloproliferative neoplasias in México. Hematology 2009; 14: 261-265.

Ruiz-Argüelles Gj, López-Martínez B, Lobato-Mendizabal E, Ruiz-Delgado Gj, An addition to geographic hematology: Chronic myeloproliferative diseases are infrequent in Mexican Mestizos. Int J. Hematol 2002;75:499-502.

Labastida-Mercado N, Galindo-Becerra S, Garcés-Eisele J, Colunga-Pedraza P, Guzman-Olvera V, Reyes-Nuñez V, Ruiz-Delgado GJ, Ruiz-Argüelles GJ. The mutation profile of JAK2, MPL and CALR in Mexican patients with Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. Hematol Oncol Stem Cell Ther. 2015 Mar;8(1):16-21. doi: 10.1016/j.hemonc.2014.12.002. Epub 2015 Jan 21.

Colunga-Pedraza PR, Gomez-Cruz GB, Colunga-Pedraza JE, Ruiz-Argüelles GJ. Geographic Hematology: Some Observations in Mexico. Acta Haematol. 2018;140(2):114-120. doi: 10.1159/000491989. Epub 2018 Sep 18. PMID: 30227427.

Talpaz, M., Kurzrock, R. et al. "Recent advances in the therapy of chronic myelogenous leukemia". Important Adv Oncol 1988; 297-321.

Tefferi, A. "Chronic myeloid disorders: Classification and treatment overview". Sem Hematol 2001;38(Suppl 2):1-4.

Tefferi, A., Silverstein, M.N. "Myeloproliferative disorders and Myelodysplastic Syndromes". In Hematology 1997, Education Program, American Society of Hematology. San Diego, CA. December 5-9, 1997;166-176.

Capítulo

29

MIELOFIBROSIS

Guillermo J. Ruiz Argüelles, Guillermo J. Ruiz Delgado y Guillermo Ruiz Reyes

RESUMEN

Las neoplasias mieloproliferativas crónicas son un grupo de enfermedades clonales que suponen la producción desordenada y descontrolada de elementos de la serie mieloide, eritroide o trombocítica en la médula ósea. Todos estos padecimientos están relacionados entre sí, y también con la leucemia aguda mieloblástica. En la **Mielofibrosis primaria** hay producción exagerada de fibras de colágeno aparentemente en respuesta a la proliferación de elementos de serie trombocítica.

1. INTRODUCCIÓN

Las neoplasias mieloproliferativas (NMP) crónicas son patologías caracterizadas por mieloproliferación monoclonal que involucra linajes múltiples, que conservan un grado variable de maduración celular y que tienen el potencial para seguir una evolución clonal. Las NMP agudas corresponden a las leucemias agudas mieloblásticas. De manera simplista, se pueden reconocer, según la línea celular mayormente afectada, cuatro variedades de SMP crónicas: (a) Policitemia vera (PV), (b) Trombocitosis esencial (TE), (c) Leucemia granulocítica crónica/Leucemia Mieloide crónica (LGC/LMC) y (d) Mielofibrosis primaria (MF) La clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS 2008) organiza las neoplasias mieloproliferativas según se indica en la tabla 27-1 (ver capítulo 27).

Estas neoplasias mieloproliferativas crónicas son de naturaleza clonal, primarias y no secundarias a un estímulo de tipo infeccioso u hormonal. Su patogenia es diferente de la de las leucoeritroblastosis reactivas (antes llamadas reacciones leucemoides) o de las eritrocitosis originadas, por ejemplo, por producción excesiva de eritropoyetina. El proceso proliferativo no está limitado en forma estricta a una sola línea hematopoyética, sino que incluye en mayor o menor proporción a varias líneas celulares. En la figura 27-1 (ver capítulo 27) se muestra la interrelación que existe entre todas las neoplasias mieloproliferativas (NMP) crónicas y las leucemias agudas mieloblásticas. Las diversas líneas celulares implicadas en las NMP derivan de un ancestro común indiferenciado o pluripotencial y no a la célula comprometida para producir eritrocitos, granulocitos o trombocitos; en este sentido las NMP deben considerarse como enfermedades malignas originados en las células pluripotenciales hematopoyéticas (CPH) o células troncales *(stem cells)*.

La **mielofibrosis primaria** (MP) está caracterizada por aparición y crecimiento de células mieloides en tejidos en que no se encuentran normalmente las células hemopoyéticas en el adulto. Tal hemopoyesis extramedular casi siempre se asocia con fibrosis de médula ósea, que muy a menudo se ha desarrollado en ausencia de causa evidente. Es por esto que los nombres más comúnmente

utilizados para designar al padecimiento son mielofibrosis y metaplasia mieloide agnogénica (MMA). Parece que la MF / MMA, que daña la cavidad medular, trata de compensarse con hematopoyesis extramedular, siendo esta la metaplasia mieloide agnogénica (MMA). Existen formas de MF / MMA secundarias a otros padecimientos mieloproliferativos, incluyendo a algunas leucemias agudas como la leucemia aguda megacarioblástica (LMA, M7 según FAB). No se conoce la causa de la MF / MMA. Muchos casos suponen proliferación clonal de una célula troncal mieloide anormal pero "restringida". Como el tejido colágeno no es clonal, se ha especulado que la fibrosis es probablemente reactiva a la proliferación clonal de precursores granulocíticos y trombocíticos y se ha señalado que algunas substancias producidas por estas células como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) es en parte el responsable de la proliferación anormal del colágeno en la cavidad medular.

2. PATOGÉNESIS

Los estudios cromosómicos de colonias de células progenitoras hemopoyéticas han establecido que una anormalidad citogenética clonal está presente en normoblastos, neutrófilos, macrófagos, basófilos y megacariocitos pero no en el tejido fibroso. Al inicio puede haber mielodisplasia o es posible que aparezca más tarde como un proceso patogénico dominante y lleve a granulocitopenia o trombocitopenia. A menudo se encuentra anemia que resulta de la combinación de eritropoyesis ineficaz, supervivencia acortada del glóbulo rojo y efectos de la esplenomegalia masiva sobre la distribución de los eritrocitos en la circulación. En algunos casos, la hemólisis puede constituir un factor importante.

3. EPIDEMIOLOGÍA

No se conoce con exactitud la incidencia de la MF/ MMA pero es posible que sea de entre 0.2 y dos pacientes/100.000 habitantes. Se considera mucho más frecuente en sujetos de raza blanca que en las poblaciones negra, japonesa o mexicana. La incidencia en varones y mujeres es aproximadamente igual. Es un padecimiento de la edad adulta y la vejez; la mediana al diagnóstico es aproximadamente de 60 años, aunque también se han informado casos en niños.

4. DATOS CLÍNICOS

En los pacientes jóvenes, el curso casi siempre es más agresivo que en los adultos. Alrededor de 25% de los casos está asintomático al momento del diagnóstico, el cual se efectúa gracias al examen médico realizado por otra causa. En los pacientes sintomáticos se encuentran quejas inespecíficas como fatiga, debilidad, disnea y palpitaciones. Puede haber pérdida de peso, pero es poco frecuente hallar anorexia y diaforesis profusa nocturna. También es posible que exista dolor en el cuadrante superior izquierdo del abdomen y plenitud pos-

prandial inmediata. En unos cuantos enfermos, puede haber hemorragia caracterizada por equimosis fáciles. Es posible que el dolor óseo sea intenso, sobre todo en los miembros pélvicos. La esplenomegalia está presente casi en todos los pacientes al momento del diagnóstico. En una tercera parte, la esplenomegalia es leve; en otro tercio, el crecimiento es moderado y en el tercio restante, el incremento es marcado al grado que el borde inferior del bazo llega a la espina ilíaca y el borde derecho cruza la línea media. Se encuentra hepatomegalia en dos tercios de los casos.

5. ESTUDIOS DE LABORATORIO

La anemia está presente en la mayoría de los enfermos al momento del diagnóstico; en general, es leve a moderada al inicio y se acentúa más conforme la enfermedad progresa. El hallazgo típico del padecimiento es la presencia de eritrocitos en forma de lágrima y de eritroblastos. También se observan células fragmentadas, codocitos y con basofilia difusa. Los reticulocitos están un poco aumentados pero pueden presentar gran variación aun en un mismo caso. La supervivencia eritrocítica está acortada en casi todos los pacientes y esto origina que la bilirrubina indirecta esté aumentada. También se ha informado aplasia pura de serie roja en algunos casos. No siempre es posible atribuir la anemia a producción disminuida en una médula fibrótica. El recuento total de leucocitos está aumentado a expensas de los granulocitos. Es infrecuente observar cifras mayores a 50 x 109/L. En todos los pacientes se encuentran promielocitos y mielocitos y también una baja proporción de blastos. Es posible encontrar hipersegmentación, hiposegmentación (anomalía adquirida de Pelger-Hüet) y granulación anormal en los neutrófilos. La MF / MMA constituye una de las causas de leucoeritroblastosis o anemia leucoeritroblástica. En la sangre periférica siempre se encuentran eriblastos y granulocitos jóvenes, aunque sea en pequeña cantidad. Las plaquetas están aumentadas en una tercera parte o incluso en la mitad de los enfermos al momento del diagnóstico, pero conforme la enfermedad avanza va apareciendo trombocitopenia. Generalmente no se obtiene muestra cuando se aspira la médula ósea. Es necesario realizar biopsia medular para poder demostrar la fibrosis. La tinción con plata demuestra de manera invariable la presencia de fibras de reticulina y en la mitad de los casos se encuentra gran aumento de tales fibras. No existe el mismo grado de fibrosis en toda la médula ósea. La anormalidad cromosómica más frecuente es la trisomía del cromosoma 8, seguida en orden decreciente por trisomía del 9 y monosomía parcial o completa del 7.

6. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de MF / MMA debe hacerse con base en los siguientes criterios mostrados en la tabla 29-1.

Tabla 29-1. Criterios diagnósticos de mielofibrosis primaria (OMS)

Criterios mayores
1.- Aumento y atipia de megacariocitos acompañada de reticulina y/o fibrosis por colágena grado 2 o 3. 2.- Ausencia de criterios para TE, PV, LGC, SMD O OTRAS NMP. 3.- Presencia de mutacion en JAK2, CALR o MPL, o en ausencia de estas la presencia de otro marcador clonal, o ausencia de mielofibrosis reactiva.
Criterios menores
Presencia de al menos uno de los siguientes confirmado dos veces consecutivas: a. Anemia no atribuible a otra condición b. Leucocitosis >= 11x10 9 /L c. Esplenomegalia d. DHL elevada e. Leucoeritroblastosis

Para el diagnóstico se requiere cumplir tres criterios mayores y al menos un criterio menor.

7. TRATAMIENTO

El tratamiento debe ser de apoyo y debe dirigirse a las complicaciones específicas. Muchos pacientes no necesitan tratamiento por períodos prolongados. Las principales indicaciones de la esplenectomía son esplenomegalia dolorosa por infartos esplénicos repetidos, trombocitopenia refractaria, anemia hemolítica refractaria e hipertensión portal. Algunos autores han sugerido que debe hacerse esplenectomía a todos los pacientes en cuanto se establece el diagnóstico de MF / MMA. El clorhidrato de anagrelide es una presentación oral de un derivado de imidazoquinazolina con actividad trombocitopenizante en los humanos. Se ha demostrado que la droga es efectiva para disminuir el recuento de plaquetas, interfiriendo con la maduración de los megacariocitos. El anagrelide administrado por vía oral abate las cuentas plaquetarias sin causar disminución significativa de los glóbulos blancos ni de los eritrocitos. La anemia puede mejorar con el empleo de eritropoyetina humana recombinante; si se debe principalmente a disminución en la producción eritrocítica, pueden utilizarse andrógenos. Cuando se demuestra que la anemia es hemolítica, está justificado administrar prednisona. La hidroxiurea reduce el tamaño del hígado y del bazo y disminuye los recuentos de leucocitos y plaquetas, así como el grado de fibrosis medular, pero no mejora la anemia. El ruxolitinib, inhibidor de JAK2, disminuye los síntomas y el tamaño del bazo. El trasplante de médula ósea, cuando es posible, logra la remisión del padecimiento y la desaparición de la mielofibrosis.

8. LECTURAS SUGERIDAS

Tefferi A, Pardanani A. Myeloproliferative Neoplasms: A Contemporary Review. JAMA Oncol 2015 Apr;1(1):97-105.

Ruiz-Argüelles, G.J., López-Martínez, B., Lobato-Mendizábal, E., Ruiz-Delgado, G.J. "An addition to geographic hematology: Chronic myeloproliferative diseases are infrequent in Mexican Mestizos". Int J Hematol, 2002, 75:499-502.

Ruiz-Argüelles Gj, Garcés-Eisele J, Ortiz-López, et al. Molecular caracterización of chronic myeloproliferative neoplasias in México. Hematology 2009; 14: 261-265.

Ruiz-Argüelles Gj Gárces-Eisel J, Reyes-Nuñez V, et al. Clearance of the Janus kinase 2 (JAK2) V617F mutation after allogeneic stem cell transplantation in a patient with myelofibrosis with myeloid metaplasia. Am J. Hematol. 2006;82:400-2.

Ruiz-Argüelles Gj, López-Martínez B, Lobato-Mendizabal E, Ruiz-Delgado Gj, An addition to geographic hematology: Chronic myeloproliferative diseases are infrequent in Mexican Mestizos. Int J. Hematol 2002;75:499-502.

Ruiz-Argüelles Gj, Ruiz-Delgado Gj, Galo Hooker E, Sánchez-Sosa S. Ruxolitinib in chronic myelomonocytic leukemia associated myelofibrosis. A case report. J Bone Marrow Res, 2013;1:109-110.

Ruiz-Delgado Gj, Lutz-Presno J. Macias-Gallardo J, Ruiz-Argüelles Gj, Concurrent MPL515 and JAK 2V617F mutations in a patient with chronic idiopathic myelofibrosis. Case report review of the literature . Rev Hematol Mex 2011;12:138-139.

Labastida-Mercado N, Galindo-Becerra S, Garcés-Eisele J, Colunga-Pedraza P, Guzman-Olvera V, Reyes-Nuñez V, Ruiz-Delgado GJ, Ruiz-Argüelles GJ. The mutation profile of JAK2, MPL and CALR in Mexican patients with Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. Hematol Oncol Stem Cell Ther. 2015 Mar;8(1):16-21. doi: 10.1016/j.hemonc.2014.12.002. Epub 2015 Jan 21.

Colunga-Pedraza PR, Gomez-Cruz GB, Colunga-Pedraza JE, Ruiz-Argüelles GJ. Geographic Hematology: Some Observations in Mexico. Acta Haematol. 2018;140(2):114-120. doi: 10.1159/000491989. Epub 2018 Sep 18. PMID: 30227427.

Talpaz, M., Kurzrock, R. et al. "Recent advances in the therapy of chronic myelogenous leukemia". Important Adv Oncol 1988; 297-321.

Tefferi, A. "Chronic myeloid disorders: Classification and treatment overview". Sem Hematol 2001;38(Suppl 2):1-4.

Tefferi, A., Silverstein, M.N. "Myeloproliferative disorders and Myelodysplastic Syndromes". In Hematology 1997, Education Program, American Society of Hematology. San Diego, CA. December 5-9, 1997;166-176.

Capítulo

30

LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA

Vivianne Torres G.

Resumen

1. **Introducción**

2. **Epidemiología de la LLC**

3. **Patogenia**
   3.1. Evolución de la enfermedad a partir de MBL
   3.2. La célula de LLC
   3.3. Anomalías genéticas
   3.4. Microambiente tumoral

4. **Presentación clínica**

5. **Estudio de LLC**

6. **Etapificación clínica**

7. Tratamiento de LLC

7.1. Cuándo tratar LLC.

7.2. Tratamiento de primera línea en pacientes con enfermedad activa.

7.3. Tratamiento en recaída.

7.4. Tratamiento de soporte y manejo de complicaciones.

8. Lecturas sugeridas

RESUMEN

La leucemia linfática o linfocítica crónica (LLC) es una neoplasia madura de células B caracterizada por una acumulación progresiva de linfocitos B monoclonales. Es la leucemia más frecuente de Europa y Estados Unidos.

La patogénesis de la LLC/SLL es un proceso complejo de varios pasos que conduce a la acumulación de linfocitos B monoclonales, maduros y funcionalmente incompetentes en la sangre periférica, la médula ósea, los ganglios linfáticos y el bazo. Las anomalías genéticas están presentes en la gran mayoría de los tumores de LLC / SLL en el momento del diagnóstico, y se adquieren anomalías genéticas adicionales con la evolución de la enfermedad.

La mayoría de los pacientes son asintomáticos. La LLC es una enfermedad heterogénea, con ciertos grupos que tienen sobrevidas similares a la de la población normal. No se ha demostrado mejoría en la supervivencia a largo plazo con el tratamiento temprano.

Los pacientes con etapas avanzadas o aquellos que demuestran síntomas o enfermedad progresiva tienen una mediana de sobrevida sin tratamiento entre 18 meses y 3 años. La terapia se ofrece con los objetivos de mejorar los síntomas y mejorar la sobrevida global y sin progresión. Los pacientes con LLC avanzada no se curan con la terapia convencional.

1. INTRODUCCIÓN

La leucemia linfática o linfocítica crónica (LLC) es una neoplasia madura de células B caracterizada por una acumulación progresiva de linfocitos B monoclonales.

La LLC se considera idéntica al linfoma linfocítico pequeño (del inglés small lymphocytic lymphoma, SLL). Las células malignas observadas en LLC y SLL tienen características patológicas e inmunofenotípicas idénticas. El término LLC se usa cuando la enfermedad se manifiesta principalmente en la sangre, mientras que el término SLL se usa cuando la afectación es principalmente ganglionar. Destaca una agregación familiar. Tiene una sobrevida a 5 años de 81,7%.

La clasificación de neoplasias hematológicas de la OMS describe a la LLC como un linfoma linfocítico leucémico, siendo solo distinguible del SLL por su manifestación leucémica. En la clasificación de la OMS, por definición, es siempre una enfermedad neoplásica de células B. La entidad descrita anteriormente como LLC-T se llama ahora leucemia prolinfocítica de células T.

Se debe distinguir de: leucemia de células velludas, manifestación leucémica de linfoma de células del manto, linfoma de zona esplénico marginal con linfocitos vellosos circulantes, y linfoma folicular. Para ello es necesario evaluar muestras de sangre, el inmunofenotipo, y, en algunos casos, rasgos genéticos de las células linfoides circulantes.

La linfocitosis monoclonal B se define como linfocitos B < 5 x 10^9/L sin adenopatías o visceromegalias (detectadas por examen físico o imágenes), ni citopenias ni síntomas relacionados con LLC. Puede progresar a LLC, requiriendo tratamiento a una tasa de 1% a 2% por año. Al igual que en los pacientes con LLC, pueden asociarse otras neoplasias, en especial las de piel, por lo que hay realizarles tamizaje de neoplasias.

Por otra parte, el linfoma linfocítico pequeño requiere de la presencia de adenopatías, y la ausencia de citopenias causada por infiltración medular clonal. Además, el número de linfocitos B en sangre periférica debe ser < 5 x 10^9/L. El diagnóstico debe ser confirmado por evaluación histopatológica de una biopsia de adenopatía o de otro tejido comprometido.

2. EPIDEMIOLOGÍA DE LA LLC

Es el tipo de leucemia más frecuente en Europa y Estados Unidos, llega a ser el 1,2% de todas las neoplasias en Estados Unidos, y representa el 25 a 35% de todas las leucemias de Estados Unidos. Es más frecuente en hombres que en mujeres, en la razón 1,7:1. Las tasas de incidencia entre hombres y mujeres en los Estados Unidos son de aproximadamente 6.75 y 3.65 casos por cada 100,000 habitantes por año, respectivamente. En todo el mundo, hay aproximadamente 191,000 casos y 61,000 muertes por año atribuidas a LLC / SLL. El SLL representa menos del 10% de los pacientes. La edad mediana de presentación es de 70 años, y la incidencia aumenta con la edad. Se observa con mayor frecuencia en las razas caucásica y negra. La incidencia de CLL / SLL es extremadamente baja en países asiáticos como China y Japón, donde se estima que ocurre a una frecuencia que es aproximadamente el 10 por ciento de la observada en los países occidentales. La incidencia de CLL/SLL en África no es tan baja como en Asia.

Según información del MINSAL (DEIS) en Chile entre 1999 y 2007, se diagnosticaron 170 a 188 LLC por año; 20 % eran menores de 15 años. Tasas esperadas desde 2010 en adelante 400 a 500 casos año país, que aún no se ha publicado. No existen factores de riesgo ocupacionales o ambientales claramente discernibles que predispongan a la LLC/SLL. LLC / SLL y otros tumores linfoides, hematológicos y sólidos ocurren con una frecuencia más alta de lo esperado entre los familiares de primer grado de pacientes con LLC / SLL. Un estudio demostró que hasta el 17 por ciento de los familiares de primer grado de pacientes con LLC encontraron por citometría de flujo que tenían linfocitosis monoclonal de células B (MBL). Si bien, prácticamente todos los casos de LLC están precedidos por MBL, solo un pequeño porcentaje de personas con MBL finalmente desarrollará LLC.

3. PATOGENIA

3.1. Evolución de la enfermedad a partir de MBL

La patogénesis de la LLC/SLL es un proceso complejo de varios pasos que conduce a la acumulación de linfocitos B monoclonales, maduros y funcionalmente incompetentes en la sangre periférica, la médula ósea, los ganglios linfáticos y el bazo. Esta evolución podemos entenderla como un proceso secuencial, con una minoría de casos progresando en cada paso:

a) Establecimiento de la linfocitosis monoclonal de células B (MBL): Se define como una población monoclonal de linfocitos B <5000 células/microL (<5 x 10^9/L) en sangre periférica, con fenotipo LLC/SLL, sin otras características de un trastorno linfoproliferativo de células B (por ejemplo, adenopatía, organomegalia, citopenias o afectación extramedular). Está presente en 5-10% de la población > 60 años, y menos frecuente en la población más joven. La MBL progresa a LLC/SLL a 2-4% al año. El desarrollo de MBL, probablemente, es una combinación de estimulación antigénica, cambios en el microambiente de la médula ósea, cambios genéticos y modificación epigenética.
b) Progresión de MBL a LLC/SLL asintomática: Se define por un aumento en esta población monoclonal de linfocitos B con un fenotipo de LLC en la sangre periférica a ≥5000 células/microL (≥5 x 10^9/L). Esta progresión es producto de mayores estímulos al clon de células B a través de cambios genéticos, cambios en la médula ósea, y el microambiente de los ganglios linfáticos. Un gran grupo de pacientes con LLC/SLL permanece asintomático a pesar del mayor número de linfocitos B monoclonales circulantes.
c) Progresión a LLC sintomática: Algunos pacientes desarrollan signos y síntomas por la acumulación de linfocitos (adenopatías, hepatoesplenomegalia, citopenias, infecciones). Estudios de secuenciación de próxima generación (NGS) demuestran que la LLC tiene grupos heterogéneos de varias subpoblaciones de células malignas que evolucionan con el tiempo.
d) Evolución a una enfermedad más agresiva: Con el tiempo y la exposición a las terapias, evolución clonal puede resultar en una LLC/SLL más agresiva y resistente al tratamiento. Una minoría de casos pueden sufrir una transformación histológica, como el Linfoma No Hodgkin Difuso de Células Grandes B (transformación de Richter).

3.2. La célula de LLC

Las células de origen de la LLC son células B clonales detenidas en la vía de diferenciación de células B en alguna etapa intermedia entre la célula pre-B y la célula B madura, tal vez en el subconjunto de las células B "activadas, experimentadas con antígenos".

Los estudios que utilizan perfiles de expresión génica sugieren que la célula de origen probablemente difiere entre los casos con y sin genes mutados de la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina (IGHV):

- LLC/SLL con IGHV no mutado: La expresión se asemeja a la de las células B CD5+ maduras del centro pregerencial (no mutadas); las células son polirreactivas y clínicamente más agresivas.
- LLC/SLL con IGHV mutado: La expresión se asemeja a la de las células B del centro postgerminal CD5+CD27+; las células tienen una especificidad de antígeno estrecha (más anérgica) y son clínicamente menos agresivas.

Se plantea la posibilidad de que LLC / SLL pueda surgir de un subconjunto normal de células B dedicadas a la producción de autoanticuerpos.

Las células LLC / SLL pueden exhibir apoptosis deteriorada y una mayor proliferación. El equilibrio cinético entre estos afecta el ritmo de la enfermedad. Los mecanismos de resistencia a la apoptosis en LLC/SLL incluyen la sobreexpresión de BCL2 y moléculas inhibidoras de Fas como TOSO. La proliferación se ve afectada por las características genéticas como el estado de mutación de IGHV, la señalización del receptor de células B y las interacciones con el microambiente tumoral y/o antígenos.

La hipogammaglobulinemia está presente en aproximadamente el 25 por ciento de los pacientes en el momento del diagnóstico inicial y puede desarrollarse en hasta dos tercios de los pacientes más adelante en el curso de la enfermedad. Se cree que la hipogammaglobulinemia está relacionada con el funcionamiento defectuoso de las células T y las células B CD5 negativas no clonales.

Los pacientes con LLC / SLL pueden tener respuestas de anticuerpos defectuosas a infecciones e inmunizaciones específicas. Los pacientes sin tratamiento previo tienen un mayor riesgo de infecciones bacterianas causadas por patógenos comunes, como Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniaey Pseudomonas aeruginosa. La respuesta a las inmunizaciones es subóptima debido a la alteración de la producción de anticuerpos y los defectos en la presentación del antígeno.

Los trastornos autoinmunes ocurren en hasta el 25 por ciento de los pacientes, dependiendo de la fase de la enfermedad. Estos incluyen anemia hemolítica autoinmune positiva para Coombs, trombocitopenia inmune (PTI), aplasia pura de glóbulos rojos y granulocitopenia autoinmune. El desarrollo de fenómenos autoinmunes en pacientes con LLC / SLL es probablemente un proceso complejo que involucra las células B malignas, las células B policlonales residuales y las células T en el microambiente tumoral, y múltiples mecanismos pueden estar involucrados.

Las células LLC/SLL expresan receptores de antígeno de células B (BCR) con un repertorio limitado de inmunoglobulinas caracterizado por un uso restringido de cadena pesada y ligera (conocido como estereotipia BCR). La estereotipia BCR en casos de LLC/SLL sugiere un papel de los antígenos en la patogénesis y evolución de LLC/SLL.

3.3. Anomalías genéticas

Las anomalías genéticas están presentes en la gran mayoría de los tumores de LLC / SLL en el momento del diagnóstico, y se adquieren anomalías genéticas adicionales con la evolución de la enfermedad (tabla 30-1). Al menos una de las cuatro anomalías cromosómicas comunes se puede detectar mediante hibridación *in situ* de fluorescencia interfase (FISH) en aproximadamente el 80% de los tumores LLC/SLL. Las anomalías citogenéticas parecen estar restringidas a las células B en LLC/SLL.

Las vías de señalización que son clave para comprender la biología de la LLC / SLL desde una perspectiva clínica incluyen las siguientes:

- Señalización BCR independiente del antígeno: la activación constitutiva de BCR da como resultado señales intracelulares que promueven el crecimiento, la supervivencia, la diferenciación y la migración.
- Regulación al alza de BCL2 – BCL2 es una proteína antiapoptótica; cuando se sobreexpresan, las células de la LLC no responden adecuadamente a las señales que deberían inducir la apoptosis.
- Deterioro de la respuesta al daño del ADN: los tumores LLC / SLL con deleción 17p, mutación TP53 o deleción 11q carecen de mecanismos para inducir la detención del ciclo celular y la apoptosis en respuesta a factores estresantes como el daño al ADN inducido por la quimioterapia.

La secuenciación del exoma completo o del genoma completo de próxima generación ha identificado anomalías genómicas adicionales, como mutaciones en NOTCH1 o SF3B1 que tienen importancia tanto patógena como pronóstica. Sin embargo, se necesitan más datos de ensayos prospectivos para validar el valor pronóstico y predictivo de estas anomalías genómicas antes de que podamos recomendar su uso en la práctica habitual.

3.4. Microambiente tumoral

Las células de LLC influyen en la composición de las células que las rodean y dependen en gran medida de las señales de estas células para su propia supervivencia y proliferación. Las interacciones bidireccionales ocurren entre las células de la LLC y la matriz extracelular, las células T, las células nodrizas (macrófagos derivados de monocitos), las células dendríticas foliculares estromales y otras células estromales.

Tabla 30-1. Anomalías genéticas que se presentan LLC

Anomalías genéticas	Porcentaje presente en LLC/SLL	Producto	Evolución de LLC/SLL
Del(13q14)	50-60	La región eliminada contiene microARN miR15A y miR16A. Estos microARN regulan la expresión de proteínas implicadas en la apoptosis y el ciclo celular. El gen BCL2 queda regulado al alza.	Mejor pronóstico que del(11q22-23) y del(17p12).
Trisomía 12	10-20	Tiene un perfil de expresión génica que incluye la sobreexpresión de RUNX3.	No está claro si afecta el desarrollo y evolución de LLC/SLL.
Del(11q22-23)	10-20	La región eliminada contiene el gen de la ataxia telangiectasia (ATM), cuyo producto está involucrado en la detección del daño en el ADN y desempeña un papel importante en la progresión del ciclo celular. Las células LLC/SLL sin función ATM normal no pueden responder adecuadamente al daño en el ADN inducido por la quimioterapia.	Puede conducir a una respuesta deteriorada al daño del ADN.
Del(17p12)	4-10	La región eliminada contiene el gen TP53, que es esencial para una respuesta normal al daño del ADN que conduce a la apoptosis. Las células CLL/SLL sin función normal de TP53, ya sea a través de del(17p12) o a través de la mutación TP53, no pueden desencadenar la apoptosis en respuesta al daño del ADN inducido por la quimioterapia.	Responde mal a la quimio (inmuno) terapia, pero evoluciona significativamente mejor cuando se trata con agentes no quimioterapéuticos, como inhibidores de molécula pequeña de BTK, fosfatidilinositol 3-quinasa o BCL2.

4. PRESENTACIÓN CLÍNICA

Síntomas

La mayoría de los/as pacientes son asintomáticos, con linfocitosis pesquisada en un hemograma. Otros pacientes pueden consultar por adenopatías indoloras,

que aumentan y disminuyen de tamaño, sin desaparecer por completo. 5 a 10% de los pacientes pueden presentar síntomas constitucionales como: pérdida de peso involuntaria de ≥10% en los 6 meses anteriores, fatiga significativa (es decir, ECOG PS ≥ 2; incapacidad para trabajar o realizar actividades habituales), fiebre > 38.0 ° C durante ≥ 2 semanas sin otra evidencia de infección, y sudores nocturnos durante ≥1 mes sin evidencia de infección.

Ocasionalmente pueden consultar por infecciones, o complicaciones autoinmunes como la anemia hemolítica, trombocitopenia o aplasia roja pura de glóbulos rojos, o reacciones exageradas a picaduras de insectos.

Signos

Adenopatías. Es el signo más frecuente, presentándose en 50-90% de los pacientes con LLC/SLL. Pueden ser generalizadas o localizadas. Lo más frecuente son las ubicaciones cervical, supraclavicular y axilar. Pueden ser firmes, redondeadas y móviles, como también formar conglomerados. Es poco frecuente dolor debido a infarto esplénico.

Esplenomegalia. Es el segundo signo más frecuente, presente en 25-55 % de los casos. Suele ser indolora, con borde afilado, superficie lisa y firme.

Hepatomegalia. Puede presentarse en 15 a 25 % de los casos. Va de 2 a 6 cm bajo el reborde costal derecho, con un tamaño al percutir de 10 a 16 cm, y un borde firme con superficie lisa.

Piel. Se observa en menos de 5% de los casos. Producto de la infiltración de la piel de las células de LLC/SLL, pueden presentarse máculas, pápulas, placas, nódulos, úlceras o ampollas, sobre todo en la cara. El compromiso cutáneo puede ser demostrado por una biopsia de la lesión.

Afectación de otros órganos. Cualquier tejido linfoide puede comprometerse por LLC/SLL, incluido el anillo de Waldeyer. Pero, a diferencia de otros tipos de linfoma, rara vez se comprometen la mucosa gastrointestinal y las meninges. El riñón se puede comprometer como fenómeno paraneoplásico. Se ha descrito la glomerulonefritis membranoproliferativa, que parece ocurrir por depósito y reacción inmune a los componentes M crioprecipitantes y no crioprecipitantes. Y en raras ocasiones, enfermedad de cambio mínimo y amiloidosis.

5. ESTUDIO DE LLC

En la tabla 30-2 se muestran los estudios de laboratorio que se utilizan en el diagnóstico de LLC.

Tabla 30-2. Diagnóstico de LLC

Evaluación	Hallazgos en LLC
Morfología en Sangre periférica: Hemograma	• Linfocitosis. • Linfocitos maduros y pequeños con estrecho borde de citoplasma y núcleo denso sin nucléolos evidentes y cromatina agregada parcialmente. • Las sombras de Gumprecht o manchas celulares, se asocian a LLC. • Citopenia por infiltración medular, independiente del número de linfocitos B en sangre periférica. Un pequeño porcentaje de células más grandes o atípicas o prolinfocitos pueden encontrarse mezcladas con células con morfología típica de LLC (< 55%).
Sangre periférica: Citometría de flujo	• Presencia de > 5 x 10^9/ L linfocitos B por al menos 3 meses. • Demostrar restricción de cadenas livianas de Inmunoglobulina por Citometría de flujo. • Coexpresión de CD5 con antígenos de células B CD19, CD20 y CD23. • Cada clon de células leucémicas está restringido para la expresión de cadenas livianas de inmunoglobulinas k o λ
Otras pruebas: Genética molecular	La Hibridización in situ por fluorescencia en interfase (FISH) se puede hacer con linfocitos en sangre periférica en más del 80% de todos los casos de LLC: • Deleciones del brazo largo del cromosoma 13 (del(13q)) • Trisomía del cromosoma 12 • Deleciones del brazo largo del cromosoma 11 (del(11q)) • Deleciones del brazo corto del cromosoma 17 (del(17p)), da un pronóstico inferior y resistencia a quimioterapias con análogos de purina y alquilantes. Pero pueden ser sensibles a inhibidores de bcl-2 . Cariotipo convencional: Generalmente no está indicado para la práctica habitual, pero puede ayudar a descartar otras patologías. Un cariotipo complejo puede tener un significado de pronóstico adverso.
Estado mutacional IGHV y estereotipos de cadena pesada	Las células leucémicas utilizan genes de cadena pesada variable de inmunoglobulina (IGHV) que pueden haber sufrido o no mutaciones somáticas. El resultado de los pacientes con células leucémicas que usan un gen IGHV no mutado (generalmente definido como una homología de secuencia del 98% o más con el gen de la línea germinal más cercana) es inferior al de los pacientes con células leucémicas que utilizan un gen IGHV mutado. Por otro lado, la presencia de genes IGHV mutados, junto a otros factores pronósticos favorables, se asocia a buena respuesta a fludarabina, ciclofosfamida y rituximab.

Marcadores inmunofenotípicos	La expresión de células leucémicas de ZAP-70 y CD38 se correlaciona con la expresión de genes IGHV no mutados y puede estar asociada con un mal pronóstico.
Marcadores séricos	La β2-microglobulina tiene un valor pronóstico en varias puntuaciones multiparamétricas.
Examen de médula ósea	En LLC, típicamente 30% de las células nucleadas en el aspirado son células linfoides maduras. La extensión y el patrón de infiltración medular (difusa frente a no difusa) pueden reflejar la carga tumoral. Un aspirado de médula ósea y una biopsia generalmente no son requeridos para el diagnóstico de LLC; sin embargo, una biopsia y un aspirado de médula ósea pueden ayudar a aclarar si las citopenias (neutropenia, anemia, trombocitopenia) están relacionadas o no con la infiltración leucémica de la médula. Es obligatoria una biopsia de médula ósea para confirmar una remisión completa.

Las figuras 30-1 y 30-2 corresponden a frotis de sangre periférica de pacientes con LLC. En la primera figura se observan linfocitos maduros y pequeños con relación núcleo/citoplasma alta y núcleo denso sin nucléolos evidentes, sombras de Gumprecht. En la siguente figura se observan prolinfocitos, con presencia de nucléolos.

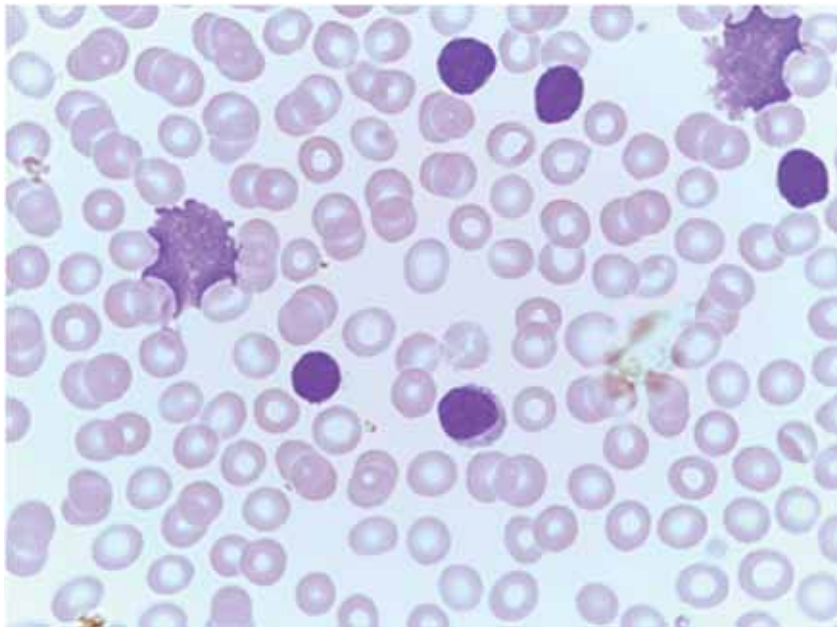


Figura 30-1. Frotis sanguíneo de paciente con LLC. Se observan los linfocitos maduros y pequeños con estrecho borde de citoplasma y núcleo denso sin nucléolos evidentes y cromatina agregada parcialmente, además de las sombras de Gumprecht (Foto gentileza de TM. Mg. María Soledad Rybertt S., Académica Unidad Hematología, Instituto de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile).

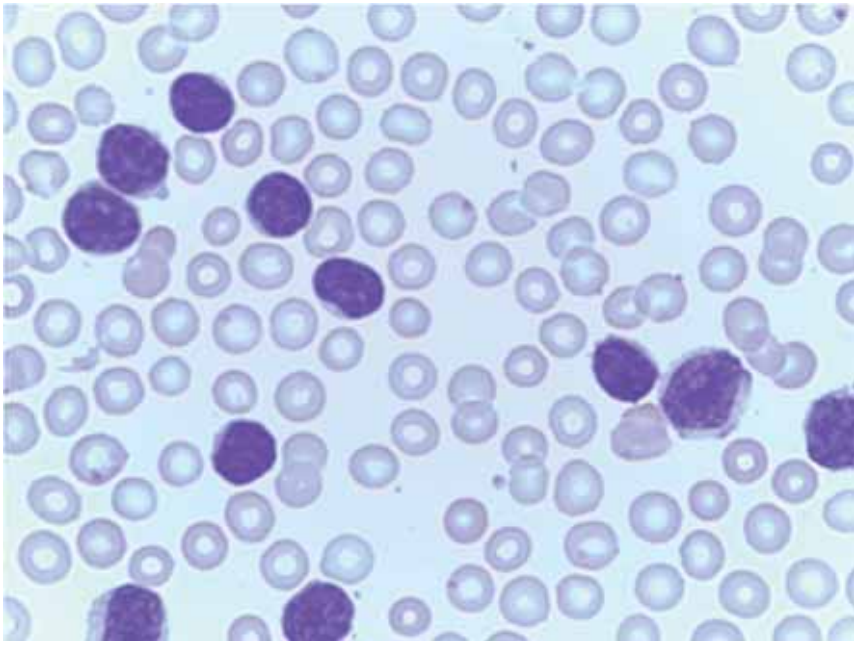


Figura 30-2. Frotis sanguíneo de paciente con LLC. Se observan prolinfocitos, células más grandes que el linfocito de la LLC, con nucléolo. (Foto gentileza de TM. Mg. María Soledad Rybertt S., Académica Unidad Hematología, Instituto de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile).

Como se indicó antes, parte del diagnóstico de LLC es el inmunofenotipo. La figura 30-3 muestra el resultado en el caso de un paciente con LLC.

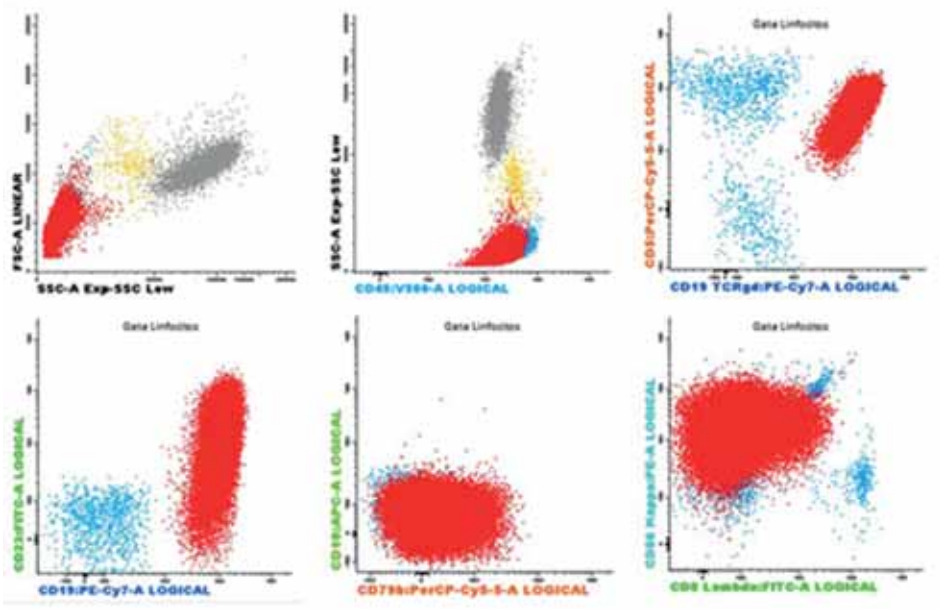


Figura 30-3. Inmunofenotipo de paciente con LLC. El forward scatter (FSC) traduce tamaño y el side scatter (SSC) la granularidad. Las células neoplásicas son similares a linfocitos normales, lo cual se aprecia en primer gráfico. Gate linfocitos significa que solo se miran linfocitos junto a células neoplásicas. Células neoplásicas rojo, linfocitos en celeste, monocitos en amarillo, granu-

locitos en gris. Informe de esta citometría: Características de las células neoplásicas: tamaño y granularidad similar a los linfocitos. Se detectó una población de células con el inmunofenotipo CD5+, CD19+, CD20+, CD23+, CD43-/+, CD45-/+ y cadenas livianas kappa+ que constituyen el 89.4% del total y 97.4% de los linfocitos (Gentileza de Dra. Lilian Pilleux, Hematóloga, Académica, Instituto de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile).

La evaluación inicial de pacientes con LLC incluye diferentes tipos pruebas: para establecer diagnóstico, evaluación pre-tratamiento y pruebas adicionales antes del tratamiento (tabla 30-3).

Tabla 30-3. Evaluación inicial de pacientes con LLC en la práctica clínica.

Pruebas para establecer el diagnóstico
Hemograma y recuento diferencial.
Inmunofenotipo de linfocitos de sangre periférica.
Evaluación antes del tratamiento
Anamnesis, examen físico, hemograma.
Aspirado y biopsia de médula ósea en caso de citopenias o cuando esté clínicamente indicado.
Perfil bioquímico, inmunoglobulinas séricas, y prueba de antiglobulina directa (TAD).
Radiografía de tórax.
Estado de enfermedad infecciosa.
Pruebas adicionales antes del tratamiento
Citogenética molecular (FISH) para del (13q), del (11q), del (17p), trisomía 12 en linfocitos de sangre periférica.
Mutación TP53.
Estado mutacional IGHV.
B2 microglobulina en sangre sería deseable.

6. ETAPIFICACIÓN CLÍNICA

Hay dos sistemas de estadificación ampliamente aceptados para su uso tanto en la atención del paciente como en los ensayos clínicos: Rai (Tabla 30-4) y Binet (Tabla 30-5). Utilizan el examen físico y el hemograma completo para estratificar a los pacientes en tres grupos de riesgo (bajo, intermedio y alto) con diferente sobrevida global e identificar a los pacientes que se beneficiarían del tratamiento.

Tabla 30-4. Sistema de etapificación RAI modificado para LLC.

Riesgo	Etapa	Descripción	Mediana de Sobrevida global
Bajo	0	Linfocitosis en sangre y médula ósea	>150 meses
Intermedio	I	Linfocitosis + adenopatías	101 meses
	II	Linfocitosis + hepatomegalia o esplenomegalia con o sin adenopatías	71 meses
Alto	III	Linfocitosis + anemia (Hb < 11 g/dl) con o sin hepatomegalia, bazo o ganglios linfáticos.	19 meses
	IV	Linfocitosis + trombocitopenia (recuento de plaquetas < 100.000/microL) con o sin anemia o hepatomegalia, bazo o adenopatías.	19 meses

Tabla 30-5. Sistema de etapificación Binet para LLC.

Etapa	Descripción	Mediana de Sobrevida global
A	2 ó menos regiones de adenopatías *	Comparable a controles de igual edad
B	3 ó más regiones de adenopatías *	84 meses
C	Presencia de anemia (Hb < 10 g/dl) o trombocitopenia (recuento de plaquetas < 100.000/microL)	24 meses

*, Cinco áreas linfoides son posibles: cervical, axilar, inguino-femoral, bazo e hígado. Se considera como adenopatía > 1 cm.

Si bien puede haber otras causas de citopenias (por ejemplo, citopenias autoinmunes, terapia previa, enfermedad coexistente), estas no se tienen en cuenta al determinar la etapa IV. Sin embargo, los pacientes con citopenias debidas a procesos autoinmunes parecen tener un mejor pronóstico que los pacientes con citopenias debido a insuficiencia de la médula ósea.

7. TRATAMIENTO DE LLC

7.1. Cuándo tratar LLC

La LLC es una enfermedad heterogénea, con ciertos grupos que tienen sobrevidas similares a la de la población normal. Por otro lado, no se ha demostrado mejoría en la supervivencia a largo plazo con el tratamiento temprano.

En la práctica general, los pacientes con enfermedad asintomática de estadio temprano (RAI 0, Binet A) deben monitorizarse sin terapia, a menos que tengan evidencia de progresión de la enfermedad o síntomas relacionados. Aunque los pacientes con enfermedad de riesgo intermedio (estadios I y II) y de alto riesgo

(estadios III y IV) según la clasificación de Rai modificada o en estadio B o C de Binet suelen beneficiarse del inicio del tratamiento, algunos de estos pacientes (en particular, el riesgo intermedio de Rai o el estadio B de Binet) se pueden monitorear sin terapia hasta que tengan evidencia de enfermedad progresiva o sintomática (resumida como "enfermedad activa").

La enfermedad activa debe documentarse claramente para iniciar la terapia. Se debe cumplir al menos uno de los siguientes criterios:

a) Evidencia de insuficiencia medular progresiva manifestada por el desarrollo o empeoramiento de anemia y / o trombocitopenia. Niveles de corte de Hb 10 g / dL o recuentos de plaquetas < 100 x 10^9 / L se consideran generalmente como indicación de tratamiento. Sin embargo, en algunos pacientes, el recuento de plaquetas < 100 x 10^9 / L puede permanecer estable durante un largo período; esta situación no requiere automáticamente una intervención terapéutica.
b) Esplenomegalia masiva (es decir, > 6 cm por debajo del margen costal izquierdo) o progresiva o sintomática.
c) Conglomerado de adenopatías (es decir, > 10 cm de diámetro más largo) o adenopatía progresiva o sintomática.
d) Linfocitosis progresiva con un aumento de > 50% durante un período de 2 meses, o tiempo de duplicación de linfocitos (LDT), 6 meses. La LDT puede obtenerse por extrapolación de regresión lineal de los recuentos absolutos de linfocitos obtenidos a intervalos de 2 semanas durante un período de observación de 2 a 3 meses; pacientes con recuentos iniciales de linfocitos en sangre, < 30 x 10^9/ L puede requerir un período de observación más largo para determinar la LDT. Deben excluirse los factores que contribuyen a la linfocitosis distintos de la LLC (p. Ej., Infecciones, administración de esteroides).
e) Complicaciones autoinmunes que incluyen anemia o trombocitopenia que responden mal a los corticosteroides.
f) Afectación extraganglionar sintomática o funcional (p. Ej., Piel, riñón, pulmón, columna).
g) Síntomas relacionados con la enfermedad, según lo definido por cualquiera de los siguientes:
- Pérdida de peso involuntaria > 10% en los 6 meses anteriores.
- Fatiga significativa (es decir, escala de rendimiento ECOG 2 o peor; no puede trabajar o no puede realizar las actividades habituales).
- Fiebre > 38.0 ° C durante 2 o más semanas sin evidencia de infección.
- Sudoración nocturna por > 1 mes sin evidencia de infección.

Dado que es muy poco frecuente la leucoestasia en los pacientes con LLC, el recuento de linfocitos absoluto no debiera ser usado como el único indicador de tratamiento.

En este momento, la presentación clínica y el curso del paciente son de mayor peso e importancia que los resultados de marcadores pronósticos específicos.

Algunos pacientes con LLC en etapa temprana requieren terapia dentro de los primeros años, mientras que otros permanecen asintomáticos sin tratamiento durante décadas. El IPS-E (International Prognostic Score for Early-stage CLL) utiliza tres variables (IGHV no mutado, linfocitos >15,000/microL, ganglios linfáticos palpables) para estratificar a los pacientes con LLC en etapa temprana en el momento del diagnóstico en tres grupos de riesgo con diferente probabilidad de requerir tratamiento a uno y cinco años:

- Bajo riesgo (sin factores de riesgo): <1 por ciento tratado a 1 año; 8 por ciento tratado a los 5 años.
- Riesgo intermedio (un factor de riesgo): 3 por ciento tratado a 1 año; 28 por ciento tratado a los 5 años.
- Alto riesgo (dos o tres factores de riesgo): 14 por ciento tratado a 1 año; 61 por ciento tratado a los 5 años.

7.2. Tratamiento de primera línea en pacientes con enfermedad activa.

Los pacientes con etapas avanzadas o aquellos que demuestran síntomas o enfermedad progresiva tienen una mediana de sobrevida sin tratamiento entre 18 meses y 3 años. La terapia se ofrece con los objetivos de mejorar los síntomas y mejorar la sobrevida global y sin progresión. Los pacientes con LLC avanzada no se curan con la terapia convencional.

Es difícil estimar la sobrevida con terapias modernas que incorporan agentes novedosos dado el breve seguimiento de los ensayos que evalúan estas combinaciones. Con los nuevos fármacos, la sobrevida global esperada puede variar de unos pocos años a décadas y depende de las características de la enfermedad, las características del paciente y la elección del tratamiento.

No existe un régimen de tratamiento de primera línea estándar único acordado para todos los pacientes con LLC sintomática o avanzada. Hay varias opciones de tratamiento inicial. Si bien las tasas de sobrevida global con los diferentes regímenes pueden ser similares, difieren en sus tasas de remisión completa, el tiempo hasta la progresión y las toxicidades asociadas. La elección entre estas terapias se realiza en base a las características del paciente y del tumor y los objetivos de la terapia. Los grupos de drogas a usar son los siguientes:

a) Inhibidores de la tirosina quinasa de Bruton (BTK) (Ibrutinib, Acalabrutinib) y los Inhibidores de BCL-2 (Venetoclax). Recomendados en todos los grupos de pacientes con indicación de tratamiento, en especial, para aquellos pacientes con del17p o mutación del TP53 o para los pacientes con IGHV no mutado.
b) Anticuerpos monoclonales anti CD 20 (Rituximab, Obinutuzumab). Se usan en combinación con las demás drogas.
c) Análogos de purina (Fludarabina, Pentostatina).
d) Agentes alquilantes (Clorambucil, Ciclofosfamida, Bendamustina). Muchos esquemas muestran sus resultados comparándose con Clorambucil, droga que se ha usado por muchos años y es bien tolerada en los adultos mayores.

7.3. Tratamiento de pacientes en recaída

Se usan las drogas mencionadas que no haya recibido el paciente en primera línea.

El trasplante de progenitores hematopoyéticos alogénico está reservado para pacientes fit con enfermedad en recaída.

7.4. Tratamiento de soporte y manejo de complicaciones:

Anemia hemolítica autoinmune y PTI

La relación entre LLC y citopenias autoinmunes está bien establecida. Se comprenden cada vez más los posibles mecanismos, en particular el papel de las células leucémicas en la estimulación de la producción de autoanticuerpos policlonales. La trombocitopenia autoinmune (PTI) y la anemia hemolítica autoinmune (AHAI) como una única anomalía causada por LLC deben tratarse inicialmente con corticoides y no inicialmente con quimioterapia o agentes dirigidos. Las opciones de tratamiento de segunda línea para AHAI incluyen rituximab, esplenectomía, inmunoglobulinas intravenosas y / o terapia inmunosupresora con agentes como ciclosporina A, azatioprina, ciclofosfamida en dosis bajas o alemtuzumab. Algunos pacientes con PTI que no responden a los corticoides pueden beneficiarse del rituximab, agentes inmunosupresores (p. Ej., Micofenolato) o análogos de trombopoyetina. La refractariedad de las citopenias autoinmunes al tratamiento es una indicación de tratamiento dirigido a la LLC subyacente. En este sentido, los sistemas de estadificación de Binet o Rai no distinguen entre PTI / AHAI o infiltración de médula ósea como causa de anemia o trombocitopenia que da lugar a clasificar a un paciente en estadio C o enfermedad de alto riesgo.

Prevención de infecciones por vacunación y sustitución de Inmunoglobulina

Las infecciones son problemas frecuentes durante el tratamiento de los pacientes con LLC. Recientemente se han publicado excelentes reseñas sobre su prevención y terapia. No existen estudios aleatorizados que demuestren que la vacunación pueda alterar las tasas de infección o los resultados de infecciones adquiridas en la LLC. En general, se recomienda que las vacunaciones de rutina se realicen antes de iniciar el tratamiento, si es posible. Las vacunas logran tasas razonables de seroprotección y seroconversión en pacientes con cáncer inmunodeprimidos, con efectos secundarios mínimos. Las vacunas conjugadas han demostrado ser altamente inmunogénicas y se prefieren, cuando estén disponibles, en pacientes con LLC. Se pueden recomendar las vacunas contra la influenza estacional y el H1N1, dada la gravedad de la pandemia H1N1 y el impacto de la influenza muy severo en los pacientes con LLC inmunodeprimidos. Las vacunas vivas están contraindicadas en pacientes con LLC porque se han informado complicaciones graves o incluso mortales.

La hipogammaglobulinemia (niveles séricos bajos de IgG e IgA con IgM variable) es una complicación bien reconocida asociada con la LLC. En cuanto a la sustitución de pacientes con LLC con hipogammaglobulinemia y antecedentes de infecciones, 6 estudios aleatorizados han demostrado que el uso profiláctico de inmunoglobulinas intravenosas disminuye la tasa de infecciones bacterianas y prolonga el tiempo hasta la primera infección, pero no produce diferencias en la supervivencia ni en otros parámetros de resultado. Por lo tanto, el uso de inmunoglobulina intravenosa no puede recomendarse de forma rutinaria, sino que debe reservarse para situaciones individuales de hipogammaglobulinemia e infecciones repetidas.

El Comité Asesor sobre Prácticas de Inmunización (ACIP) recomienda el uso de vacunas contra el COVID-19 dentro del alcance de la Autorización de uso de emergencia o la Solicitud de licencia de productos biológicos para la vacuna en particular. Las recomendaciones provisionales del ACIP para el uso de vacunas contra la COVID-19 se pueden encontrar en www.cdc.gov/vaccines/hcp/acip-recs/vacc-specific/covid-19.html.

8. LECTURAS SUGERIDAS

Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. CA Cancer J Clin 2021; 71:7.

Yamamoto JF, Goodman MT. Patterns of leukemia incidence in the United States by subtype and demographic characteristics, 1997-2002. Cancer Causes Control 2008; 19:379.

Global Burden of Disease Cancer Collaboration, Fitzmaurice C, Allen C, et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. JAMA Oncol 2017; 3:524.

Smith A, Howell D, Patmore R, et al. Incidence of haematological malignancy by sub-type: a report from the Haematological Malignancy Research Network. Br J Cancer 2011; 105:1684.

Miranda-Filho A, Piñeros M, Ferlay J, et al. Epidemiological patterns of leukaemia in 184 countries: a population-based study. Lancet Haematol 2018; 514.

Yang S, Varghese AM, Sood N, et al. Ethnic and geographic diversity of chronic lymphocytic leukaemia. Leukemia 2021; 35:433.

Cao C, Peña K, Roa M, Rojas H. Guías Prácticas Clínicas Para Diagnóstico y Tratamiento de la Leucemia Linfática Crónica. Sociedad Chilena de Hematología. 2017.

Cuttner J. Increased incidence of hematologic malignancies in first-degree relatives of patients with chronic lymphocytic leukemia. Cancer Invest 1992; 10:103.

Goldin LR, Pfeiffer RM, Li X, Hemminki K. Familial risk of lymphoproliferative tumors in families of patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the Swedish Family-Cancer Database. Blood 2004; 104:1850.

Brown JR, Neuberg D, Phillips K, et al. Prevalence of familial malignancy in a prospectively screened cohort of patients with lymphoproliferative disorders. Br J Haematol 2008; 143:361.

Goldin LR, Lanasa MC, Slager SL, et al. Common occurrence of monoclonal B-cell lymphocytosis among members of high-risk CLL families. Br J Haematol 2010; 151:152.

Hallek M. et al. IwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. Blood. 2018;131(25):2745-2760.

Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. Blood 1975;46(2):219-234.

Binet JL, Auquier A, Dighiero G, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. Cancer. 1981;48(1):198-206.

Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med. 2000; 343(26):1910-1916.

Schroeder HW Jr, Dighiero G. The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire. Immunol Today. 1994;15(6):288-294.

Damle RN, Wasil T, Fais F, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. Blood. 1999;94(6): 1840-1847.

Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. Blood. 1999; 94(6):1848-1854.

Thompson PA, Tam CS, O'Brien SM, et al. Fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab treatment achieves long-term disease-free survival in IGHV-mutated chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2016; 127(3):303-309.

Grever MR, Lucas DM, Dewald GW, et al. Comprehensive assessment of genetic and molecular features predicting outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the US Intergroup Phase III Trial E2997. J Clin Oncol. 2007;25(7): 799-804.

Crespo M, Bosch F, Villamor N, et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med. 2003;348(18):1764-1775.

Ibrahim S, Keating M, Do KA, et al. CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2001;98(1):181-186.

Lin K, Sherrington PD, Dennis M, Matrai Z, Cawley JC, Pettitt AR. Relationship between p53 dysfunction, CD38 expression, and IgV (H) mutation in chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2002;100(4):1404-1409.

Boonstra JG, van Lom K, Langerak AW, et al. CD38 as a prognostic factor in B cell chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL): comparison of three approaches to analyze its expression. Cytometry B Clin Cytom. 2006;70(3): 136-141.

Byrd JC, Gribben JG, Peterson BL, et al. Select high-risk genetic features predict earlier progression following chemoimmunotherapy with fludarabine and rituximab in chronic lymphocytic leukemia: justification for risk-adapted therapy. J Clin Oncol. 2006;24(3):437-443.

Pflug N, Bahlo J, Shanafelt TD, et al. Development of a comprehensive prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2014;124(1): 49-62.

International CLL; International CLL-IPI working group. An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. Lancet Oncol. 2016; 17(6):779-790.

Zent CS, Ding W, Schwager SM, et al. The prognostic significance of cytopenia in chronic lymphocytic leukaemia/small lymphocytic lymphoma. Br J Haematol 2008; 141:615.

Condoluci A, Terzi di Bergamo L, Langerbeins P, et al. International prognostic score for asymptomatic early-stage chronic lymphocytic leukemia. Blood 2020; 135:1859.

Pepper C, Majid A, Lin TT, et al. Defining the prognosis of early stage chronic lymphocytic leukaemia patients. Br J Haematol 2012; 156:499.

Hodgson K, Ferrer G, Montserrat E, Moreno C. Chronic lymphocytic leukemia and autoimmunity: a systematic review. Haematologica. 2011;96(5):752-761.

Capítulo

31

GAMMAPATÍAS MONOCLONALES

James Campbell Wagemann, Mauricio Ocqueteau Tacchini

Resumen

1. **Introducción**

2. **Epidemiología**

3. **Fisiopatología**

4. **Clínica**
   4.1. Hipercalcemia
   4.2. Falla renal
   4.3. Anemia
   4.4. Lesiones óseas

5. **Diagnóstico**
   5.1. Exámenes generales
   5.2. Laboratorio específico

5.3. Confirmación diagnóstica
5.4. Criterios diagnósticos

6. Pronóstico
6.1. Estratificación de riesgo

7. Tratamiento
7.1. ¿Cuándo tratar a un paciente con gammapatía monoclonal?
7.2. Tratamiento general
7.3. Tratamiento específico

8. Otras gammapatías monoclonales

9. Conclusión

10. Lecturas sugeridas

RESUMEN

El concepto de gammapatía monoclonal abarca a una serie de condiciones relacionadas con trastornos proliferativos de las células plasmáticas en la médula ósea, desde un espectro benigno, la gammapatía monoclonal de significado incierto, hasta la entidad maligna, el mieloma múltiple. El mieloma múltiple corresponde a un 1% de los diagnósticos de cáncer y es la segunda neoplasia hematológica más frecuente, representando alrededor del 10%. Pese a ser una enfermedad incurable y que puede producir secuelas muy invalidantes si no es tratada de forma oportuna, su sobrevida ha aumentado progresivamente en el tiempo, gracias a la mejoría en las medidas de soporte y las nuevas estrategias terapéuticas, que serán revisadas a lo largo de este capítulo.

Tanto la proliferación neoplásica de células plasmáticas como la inmunoglobulina monoclonal pueden generar una serie de manifestaciones clínicas y de laboratorio, siendo las más frecuentes la hipercalcemia, anemia, falla renal y enfermedad ósea ("CRAB"). Es fundamental mantener un índice de sospecha elevado y realizar un enfrentamiento diagnóstico ordenado que incluye laboratorio general, estudio de paraproteína y análisis de médula ósea, con el fin de iniciar un tratamiento oportuno.

El tratamiento del mieloma múltiple, garantizado en el plan AUGE/GES, ha demostrado revertir las complicaciones, mejorar la calidad de vida y aumentar la sobrevida.

1. INTRODUCCIÓN

El concepto "gammapatía monoclonal" (GM) abarca una serie de entidades que se caracterizan por la proliferación clonal de linfocitos B maduros, especialmente en su última etapa de maduración correspondiente a las células plasmáticas. Además de esta proliferación clonal, es posible detectar en sangre y/o en orina la presencia de una inmunoglobulina monoclonal producida por dichas células.

El espectro de GM abarca desde una etapa inicial que, si bien es clonal, tiene un comportamiento benigno, conocida como gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI) o "MGUS" por el acrónimo anglosajón de "monoclonal gammopathy of undetermined significance". Luego de ello, en algunos casos avanza hacia una fase intermedia que se llama mieloma quiescente o "smoldering" y finalmente se desarrolla el cáncer propiamente tal, que corresponde al Mieloma Múltiple (MM) (Figura 31-1).

Figura 31-1. Espectro de las gammapatías monoclonales.

Las GM son muy relevantes, no solo debido a su alta frecuencia. El MM puede tener una serie de complicaciones invalidantes, llevando a un muy importante deterioro en calidad de vida y sobrevida. Es fundamental tener un índice de sospecha elevado, ya que las manifestaciones son múltiples y forman parte del diagnóstico diferencial de muchas enfermedades. Si bien aún no existe cura para el MM, su pronóstico ha mejorado notablemente durante los últimos años, logrando mejorar la sobrevida y la calidad de vida de estos pacientes.

2. EPIDEMIOLOGÍA

La GMSI es una condición frecuente y su incidencia va aumentando a mayor edad. Está presente en alrededor de un 2% de las personas mayores de 60 años, y en un 5% de los mayores de 70 años.

Por su parte, el MM corresponde a un 1% de todos los diagnósticos de cáncer (10% de las neoplasias hematológicas) y es responsable de un 2% de las muertes por cáncer a nivel mundial. Tiene una incidencia de 3-5 casos nuevos por 100.000 personas al año. Afecta fundamentalmente a adultos mayores, siendo la mediana de edad al diagnóstico alrededor de 65-70 años. Sin embargo, en alrededor de un 15% de los casos afecta a personas menores de 50 años.

La GMSI tiene un comportamiento benigno y en general no se asocia a manifestaciones clínicas, pero su principal importancia es que puede transformarse a MM, a una tasa aproximada de 1% al año. Así, alrededor del 25% de las personas con GMSI se transforman a MM en algún momento de su vida. Por ello es muy importante realizar un seguimiento adecuado.

La entidad intermedia, el Mieloma Quiescente, tiene una tasa de progresión más elevada a MM clínicamente activo: 10% al año los primeros 5 años y luego va disminuyendo. En total aproximadamente 75% de estos casos se transformarán a MM a lo largo de su evolución.

3. FISIOPATOLOGÍA

Es importante recordar que el objetivo final de la inmunidad adaptativa humoral es la producción de células plasmáticas (CP), las cuales están encargadas de

producir anticuerpos. Los linfocitos B atraviesan una serie de etapas madurativas hasta llegar a transformarse en CP (Figura 31-2).

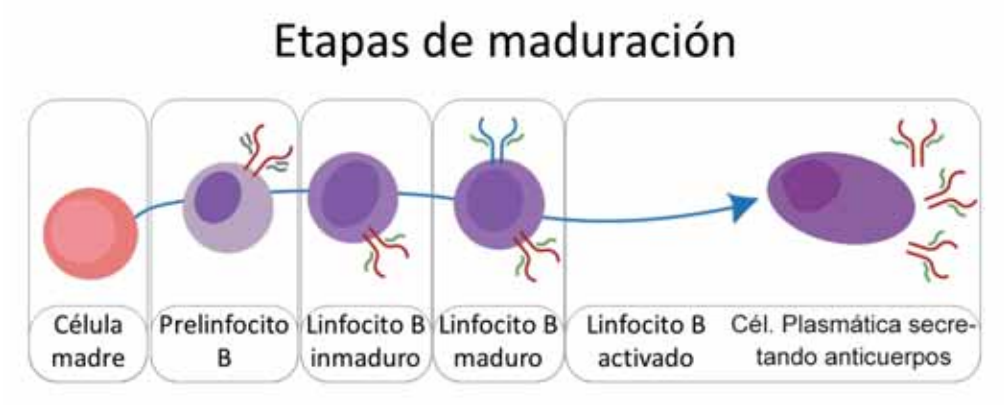


Figura 31-2. Maduración de linfocitos B hasta células plasmáticas. Abbas AK. Cellular and molecular immunology, 2018(9).

Las inmunoglobulinas (o anticuerpos) poseen una serie de funciones: neutralizan directamente a microorganismos y toxinas, participan de la opsonización de microorganismos para permitir la función de células del sistema fagocitario, activan a otras células del sistema inmune como células NK, y pueden activar el sistema del complemento.

Existen distintas moléculas de inmunoglobulinas (Ig): IgM, IgG, IgE, IgA e IgD. Cada una de ellas cumple distintos roles. La Ig está formada por una cadena pesada y una cadena liviana (Figura 31-3). Ambas tienen una región constante y otra variable. Esta región variable es la que otorga la especificidad para reconocer el antígeno y así, cada molécula es específica para un antígeno en particular. Lo normal es que en el cuerpo humano tengamos infinidad de Ig policlonales, encargadas de reconocer a los distintos antígenos (sobre 10 elevado a 9).

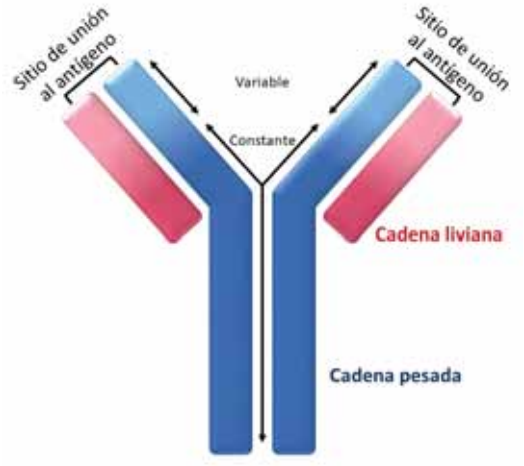


Figura 31-3. Estructura de una inmunoglobulina. Abbas AK. Cellular and molecular immunology, 2018(9).

En cuanto a la génesis del MM (Figura 31-4), a lo largo del proceso que lleva a la producción de CP normales pueden ocurrir errores. En primer lugar, tanto en el centro germinal de un ganglio linfático como en la médula ósea (MO) ocurren eventos genéticos primarios (alteraciones cromosómicas) que van a aumentar la probabilidad de que esa célula se transforme y se convierta en una CP clonal. Luego de ello, ocurre otro evento secundario (que en general es una mutación) que le va a dar a la célula mayor probabilidad de ser maligna y de progresar. Por último, la interacción de la CP con el microambiente de la MO (conocimiento más reciente y que tiene implicaciones en algunas estrategias terapéuticas) va a llevar a que esta célula se transforme en una célula maligna. Esta CP produce una Ig monoclonal, es decir, ya no hay una infinita cantidad de anticuerpos para todos los antígenos, sino que lo que predomina es la misma Ig producida por copias de la misma CP.

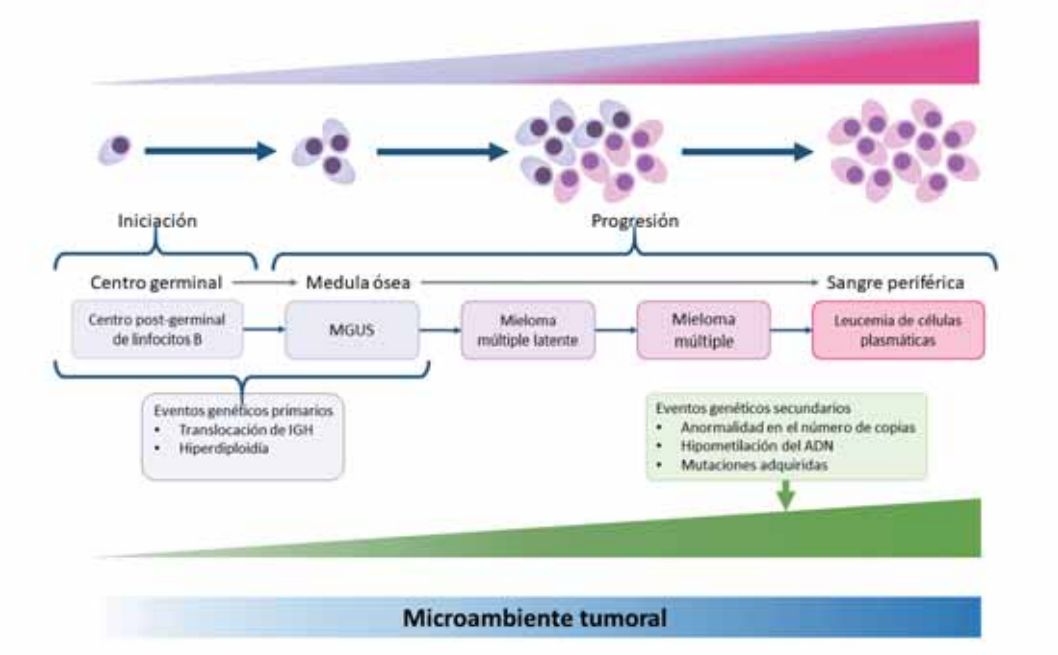


Figura 31-4. Génesis del mieloma múltiple. Nat Rev Dis Prim. 2017;3:17046.

Las manifestaciones clínicas y complicaciones del MM se producen por:
- Infiltración de la MO, con aumento de CP neoplásicas y disminución relativa de las células normales. Responsable, entre otras complicaciones, de la anemia.
- Infiltración extramedular, produciendo tumores conocidos como plasmocitomas, los que pueden ser sintomáticos y comprimir estructuras.
- Daño por la inmunoglobulina monoclonal por toxicidad directa o por depósito en algunos órganos, generando falla renal, hiperviscosidad, neuropatía o coagulopatía.
- Inmunodeficiencia (también conocida como inmunoparesia) por disminución de producción de las Ig normales, con aumento de riesgo de infecciones.

- Citoquinas producidas por las CP y/o el estroma, las cuales llevan a activación de osteoclastos, responsables de la destrucción ósea y generación de lesiones líticas óseas con riesgo de fracturas e hipercalcemia.

4. CLÍNICA

Tanto la GMSI como el mieloma quiescente se pesquisan por alteración de exámenes, pero el paciente no presenta síntomas definitorios de enfermedad. Por su parte, el MM es una enfermedad sintomática, que puede tener múltiples manifestaciones, pero las más importantes se agrupan dentro del acrónimo CRAB ("cangrejo" en inglés):
- C: hiperCalcemia
- R: falla Renal
- A: Anemia
- B: lesiones óseas ("Bone")

Otras manifestaciones pueden corresponder a la presencia de tumores (plasmocitomas), síntomas constitucionales (baja de peso, compromiso del estado general), infecciones por inmunoparesia, neuropatía y sangrado. La presencia de fiebre, frecuente en algunas neoplasias, en el caso del MM debe ser considerada como secundaria a complicaciones y no a la enfermedad en sí.

4.1. Hipercalcemia

La hipercalcemia está presente en un 15-30% de los pacientes con MM, especialmente en etapas más avanzadas. Se genera por la producción de citoquinas por parte de la CP maligna, entre ellas RANKL, que interactúan con el osteoclasto y lo activan. Además, otras moléculas inhiben a los osteoblastos. Este fenómeno, fundamental en la fisiopatología del MM, lleva a un aumento de la resorción ósea con disminución de la formación ósea (Figura 31-5). El aumento de la resorción ósea produce hipercalcemia.

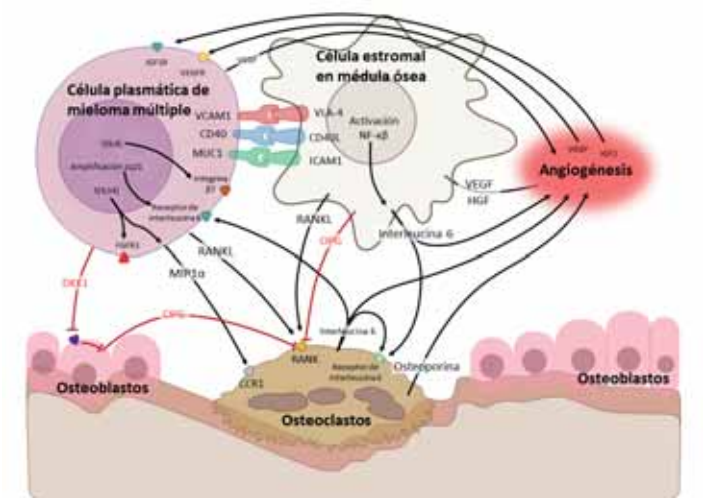


Figura 31-5. Interacción entre célula plasmática y osteoclasto / osteoblasto.
N Engl J Med. 2011; 364:1046-1060.

La hipercalcemia puede presentar una serie de manifestaciones clínicas. A nivel del sistema nervioso, puede generar desde alteraciones leves como trastornos del ánimo hasta complicaciones graves, como compromiso de conciencia e incluso coma. A nivel cardíaco, inicialmente se observan alteraciones en EKG como QT corto y, si la alteración es grave, hay riesgo de producir arritmias. A nivel gastrointestinal es frecuente el dolor abdominal y la constipación, mientras que en casos graves se puede desarrollar pancreatitis aguda. A nivel renal, puede desarrollarse poliuria secundaria a diabetes insípida, llevando a distintos grados de deshidratación. Por último, es frecuente el compromiso del sistema músculo esquelético que se manifiesta con debilidad muscular.

4.2. Falla renal

Hasta un 50% de los pacientes con MM desarrollan algún grado de disfunción renal, pero solo un 20% cumple el criterio definitorio de falla renal por MM, que corresponde a una creatinina sobre 2 mg/dL o una tasa de filtración glomerular bajo 40 mL/min. Hasta un 10% de los pacientes requiere terapia de reemplazo renal en algún momento.

Existen múltiples mecanismos por los que se produce insuficiencia renal en MM, la cual habitualmente es multifactorial:
- Obstrucción de túbulos renales por las cadenas livianas, fenómeno conocido como riñón de mieloma. Es el mecanismo más relevante. (Figura 31-6)
- Daño tubular directo.
- Daño intersticial.
- Daño glomerular, especialmente en los casos en que se deposita amiloide.
- Otros: deshidratación por hipercalcemia, fármacos utilizados para el tratamiento de MM, o el uso de antinflamatorios por dolor.

Es frecuente la realización de imágenes como parte del estudio de una insuficiencia renal. En el caso del MM, habitualmente se observan riñones de tamaño normal, siendo uno de los elementos de sospecha.

Las manifestaciones clínicas de la falla renal son variadas e inespecíficas, como compromiso del estado general, náuseas, vómitos, orina espumosa cuando hay proteinuria; mientras que en etapas más avanzadas puede haber oliguria o anuria y otras manifestaciones graves como pericarditis o encefalopatía urémica, entre otras.

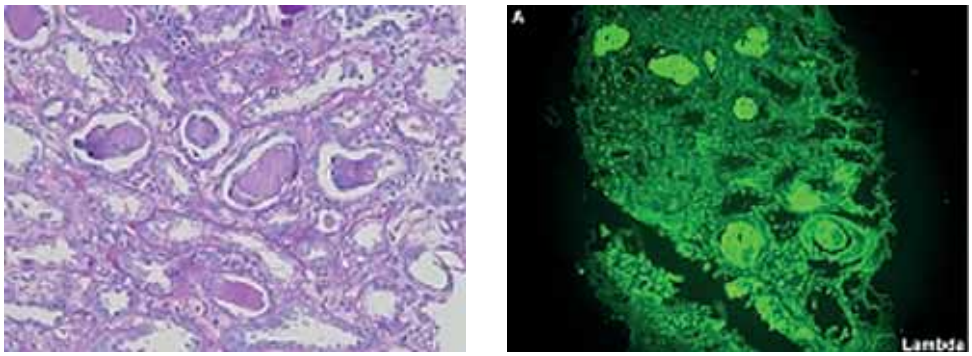


Figura 31-6. Riñón de mieloma. A la izquierda se observa depósito de contenido denso intratubular en la microscopía óptica, que en la inmunofluorescencia (a derecha) corresponde a cadena liviana lambda. AJKD 2016;10.

4.3. Anemia

Entre un 35-70% de los pacientes con MM tienen algún grado de anemia, que clásicamente es normocítica con VHS alta (usualmente sobre 80 - 100 mm/h), aunque existen algunas excepciones. Se produce por infiltración de las CP en la MO y por liberación de citoquinas que generan supresión de la eritropoyesis. Además, cuando ocurre insuficiencia renal hay disminución de la eritropoyetina. Generalmente el paciente se presenta con un síndrome anémico, caracterizado por fatigabilidad, disnea de esfuerzo progresiva, palpitaciones, mareo y cefalea. Al examen físico puede detectarse palidez, taquicardia y la presencia de un soplo sistólico aórtico eyectivo funcional. En casos más graves puede haber dolor torácico por isquemia miocárdica, especialmente en pacientes con antecedentes cardiovasculares.

4.4. Lesiones Óseas (“Bone”)

El compromiso óseo está presente en hasta un 80% de los pacientes con MM. Lo más característico son las lesiones líticas, generadas por la destrucción de tejido óseo por los osteoclastos. Pueden estar presentes en múltiples huesos (Figura 31-7), mayoritariamente del esqueleto axial, tales como calota, costillas y vértebras, y menos habitualmente en huesos largos. Estas lesiones pueden provocar dolor y fracturas. En ocasiones no solo hay destrucción ósea, sino también un tumor (plasmocitoma), que puede ser invasor y salir de la MO. Además de las lesiones, por las citoquinas y destrucción ósea es frecuente el desarrollo de osteoporosis. Probablemente la complicación más grave corresponde a la compresión de la médula espinal, lo que puede producir déficit neurológico agudo, con paresia, alteración de los reflejos y de la continencia urinaria y fecal, constituyendo una emergencia médica. El síntoma más frecuente es el dolor óseo, que en general es de predominio lumbar.

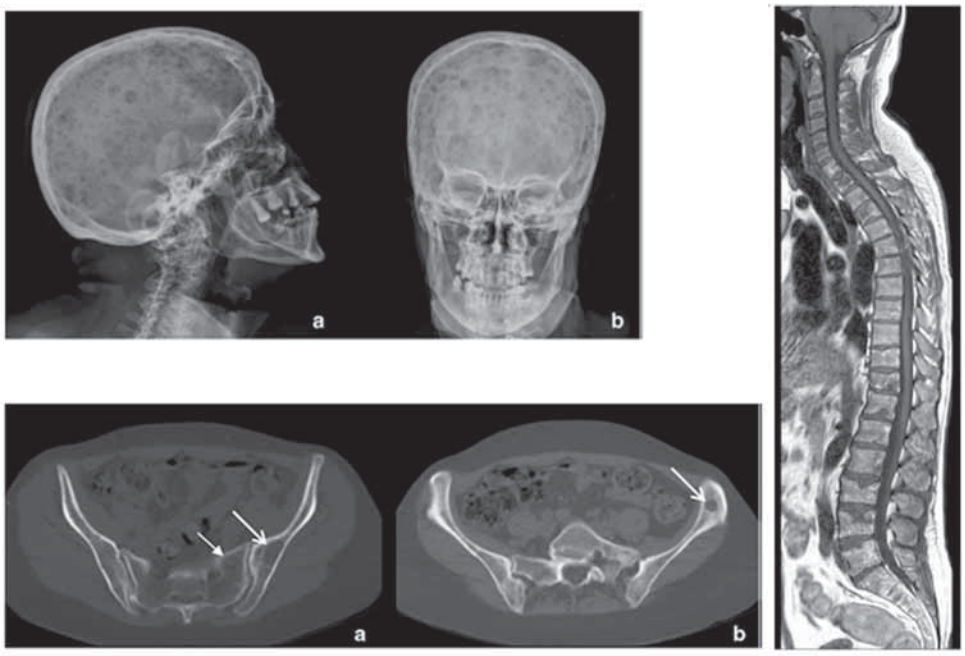


Figura 31-7. Lesiones líticas en calota, sacro, hueso ilíaco y múltiples vértebras. Neuroradiology 2020;62:905–923.

5. DIAGNÓSTICO

El enfrentamiento diagnóstico se lleva a cabo de forma ordenada:
- En primer lugar, se realizan exámenes generales, cuyo objetivo es detectar las alteraciones correspondientes al CRAB y pesquisar alteraciones sugerentes de GM.
- En segundo lugar, cuando existe sospecha, se realiza laboratorio específico cuyo objetivo es la búsqueda de la proteína monoclonal (inmunoglobulina monoclonal o paraproteína).
- En tercer lugar, si el estudio previo es sugerente, se realiza la confirmación diagnóstica con el estudio de médula ósea, en el que se busca demostrar la presencia de CP clonales.

5.1. Exámenes generales:

5.1.1. Hemograma: uno de los exámenes más importantes. Su alteración más frecuente es la anemia, que habitualmente es normocítica. Para que cumpla criterio CRAB, debe haber una disminución de al menos 2 g/dL de la hemoglobina respecto al valor normal o ser menor a 10 g/dL. Lo más frecuente es que los leucocitos y las plaquetas se encuentren en rango normal, aunque en algunos casos puede haber alteraciones con presencia de células plasmáticas en sangre y trombocitopenia, lo cual es muy infrecuente y de alta gravedad, pudiendo llegar a constituir incluso una leucemia de células plasmáticas.

Por otra parte, la VHS elevada es muy frecuente en todo el espectro de GM. La velocidad de sedimentación de la sangre se relaciona con la presencia de proteínas, por lo que cuando hay un aumento de cadenas pesadas en la sangre, especialmente monoclonales, estará aumentada. En general se acompaña de Rouleaux, que corresponde a la agrupación de los glóbulos rojos como pila de monedas. En 80% de los casos se encuentra una VHS sobre 20 y hasta en un 30% se observa VHS sobre 100. En los casos en que la Ig monoclonal esté formada solo por cadenas livianas, estas alteraciones pueden no verse ya que son eliminadas por la orina. Es muy importante no olvidar otros diagnósticos diferenciales de VHS sobre 100, como vasculitis (especialmente arteritis de células gigantes), polimialgia reumática, infecciones (tuberculosis u otras infecciones crónicas como osteomielitis o abscesos profundos) y algunas neoplasias metastásicas. Sin embargo, la presencia de anemia asociada a VHS alta, especialmente sobre 100, debe hacer sospechar una gammapatía monoclonal.

5.1.2. Perfil bioquímico: evalúa una serie de parámetros muy importantes a la hora de orientarse hacia la presencia de una GM. Las proteínas totales en la sangre incluyen a albúmina y globulinas. Dentro de las globulinas se encuentran las inmunoglobulinas, las cuales estarán elevadas en las GM, por lo tanto, es muy frecuente un aumento del recuento total de proteínas y especialmente de la diferencia entre proteínas y albúmina, que habitualmente es alrededor de 4 g/dL. Un valor mayor se conoce como disociación albúmino-proteica, y nos debe orientar a la presencia de cadenas pesadas en sangre. Por otra parte, el calcio es muy relevante de acuerdo a lo ya descrito. Para cumplir criterio CRAB de hipercalcemia, se debe observar una calcemia > 11 mg/dl o 1 mg/dL sobre lo normal. Es importante recordar que cuando hay hipoalbuminemia, se debe corregir el valor de calcio según siguiente fórmula: Ca corregido = Ca + 0.8 (4-albúmina). En caso de solicitarse PTH (parathormona) para estudio de hipercalcemia, en el caso del MM estará suprimida. Finalmente, la LDH o lactato deshidrogenasa, puede elevarse en algunos casos y es un marcador de peor pronóstico.

5.1.3. Función renal y estudio de orina: su evaluación es fundamental. Un valor de creatinina sobre 2 mg/dL o una velocidad de filtración glomerular < 40 es criterio CRAB. Como ya fue mencionado, habitualmente se observan riñones de tamaño normal. En el examen de orina se pueden detectar proteínas, que en el caso de GM/MM será una proteína monoclonal. Ya que la tira reactiva del examen de orina completa detecta fundamentalmente la presencia de albúmina, y en el MM lo que se elimina por la orina son cadenas livianas, estas pueden no ser medidas por esta técnica. Por lo tanto, se debe utilizar un indicador más específico como proteinuria de 24 horas o índice proteinuria/creatininuria. Si existe disociación, es decir, una proteinuria muy elevada con tira reactiva negativa o levemente positiva, hay que sospechar la presencia de cadenas livianas en la orina, conocida como proteinuria de Bence-Jones.

5.1.4. Estudio del compromiso óseo: Existen diversas técnicas disponibles. El estudio más antiguo era la serie radiológica compuesta por muchas radiografías: cráneo, columna, tórax, pelvis, huesos largos (húmero y fémur) y huesos

sintomáticos. Sin embargo, este examen ha sido desplazado por la disponibilidad de técnicas más sensibles como TAC de cuerpo completo de baja dosis, PET/CT o resonancia nuclear magnética. En el PET/CT además de observarse las lesiones, también se detecta el metabolismo de ellas.

El criterio CRAB corresponde al hallazgo de al menos una lesión lítica, aunque existen otras lesiones que también pueden tener impacto en el diagnóstico y/o pronóstico.

Por otra parte, el cintigrama óseo no es útil en GM, ya que detecta solo lesiones blásticas, más propias de encontrar en tumores "sólidos" (no hematopoyéticos).

5.1.5. Otros: La B2-microglobulina se asocia a carga tumoral y se utiliza como parte de los índices pronósticos. La cuantificación de inmunoglobulinas, si bien no asegura clonalidad, se relaciona con la carga tumoral y además informa del nivel de las inmunoglobulinas no comprometidas, que habitualmente se encuentran disminuidas ya que se privilegia solo la producción de la Ig clonal (hipogammaglobulinemia residual).

5.2 Laboratorio específico: se realiza cuando existe la sospecha de GM en base a la clínica y/o los aspectos ya mencionados del estudio de laboratorio general, con el objetivo de demostrar la presencia del componente monoclonal en sangre y/o en orina.

5.2.1. Electroforesis de proteínas (EFP): se basa en que las proteínas poseen carga. Se observa la migración de estas hacia el ánodo en un medio líquido o sólido, bajo la influencia de un campo eléctrico. La técnica tradicional se realiza en gel, aunque lo más utilizado en la actualidad es la técnica en capilar. Luego de la migración, se revela y grafica tal como se muestra en la Figura 31-8. Se conoce el patrón de migración de las proteínas del suero, estableciéndose distintas regiones o bandas. La albúmina corresponde a la primera región y luego se generan las regiones alfa 1, alfa 2, beta y gamma. Las inmunoglobulinas se sitúan en la zona gamma.

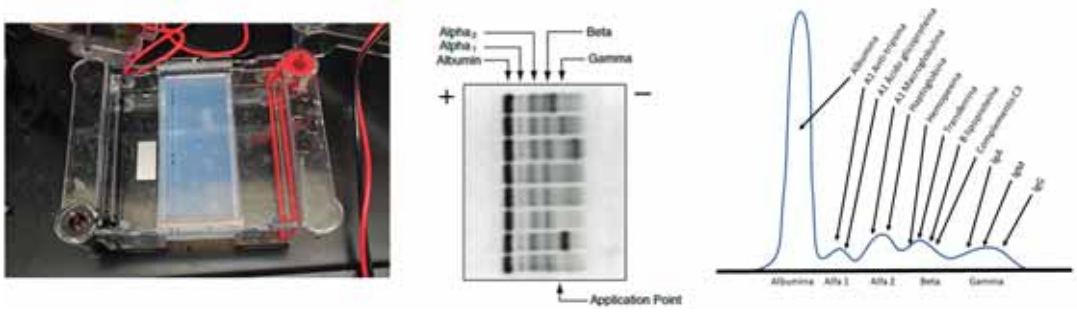


Figura 31-8. Técnica de electroforesis de proteínas. N Eng J Med. 1974;291:287-290.

Existen distintos patrones de EFP (Figura 31-9):
- Normal: se observan las distintas regiones ya comentadas.
- Hipergammaglobulinemia policlonal: aumento difuso de región gamma. En general es secundario a una reacción inflamatoria.
- Componente monoclonal: este es el patrón que se observa en GM, en donde hay un "peak" elevado en una sola zona, que refleja la presencia de una inmunoglobulina monoclonal. Habitualmente en MM se acompaña de disminución de las demás proteínas en la región gamma, lo que se conoce como hipogammaglobulinemia residual. Ocasionalmente, especialmente cuando la Ig comprometida es de tipo IgA la cual dimeriza, el "peak" puede observarse en la región beta. Esta técnica permite cuantificar el componente monoclonal, lo cual es fundamental para el seguimiento y la evaluación de la respuesta al tratamiento.
- Hipogammaglobulinemia: en ocasiones puede observarse disminución difusa de la región gamma. Si bien no es específico, puede sugerir GM de cadenas livianas.

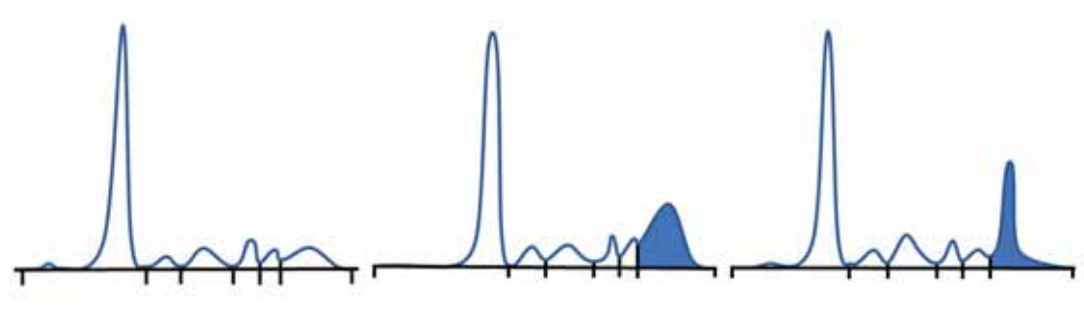


Figura 31-9. Patrones de electroforesis. A la izquierda patrón normal; al centro hipergammaglobulinemia policlonal; a la derecha componente monoclonal con hipogammaglobulinemia residual.

5.2.2. Inmunofijación (IF) de inmunoglobulinas: para caracterizar el componente monoclonal luego de realizar la EFP, en el medio se agregan anticuerpos dirigidos contra los distintos componentes de la Ig (contra cadenas pesadas de IgG, IgA, IgM y cadenas livianas Kappa y Lambda). De esta forma se determina el tipo de inmunoglobulina comprometida (Figura 31-10). No cuantifica el componente. Respecto a la EFP, tiene una mayor sensibilidad ya que permite detectar la GM de cadenas livianas que puede no detectarse solo por EFP debido a la eliminación de estas por la orina, como ya ha sido descrito. Así, la sensibilidad de la EFP es de 80-85%, mientras que la sensibilidad de la IF es de 90-95%. La combinación de ambas técnicas logra una sensibilidad de 97% para detectar componente monoclonal. En 50-60% de los casos el componente monoclonal detectado es IgG, en 25-30% es IgA, en 15% corresponde a GM de cadena liviana aislada, mientras que el 2% restante pueden ser IgD, IgM o no secretor; estos últimos casos son difíciles de diagnosticar.

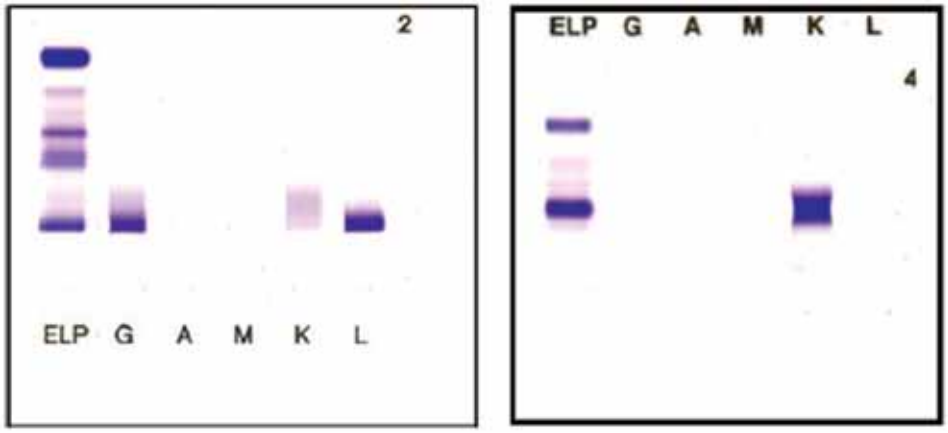


Figura 31-10. Ejemplos de inmunofijación. A la izquierda se observa un componente monoclonal de tipo IgG Lambda en sangre. A la derecha, un componente monoclonal de tipo cadena liviana Kappa en orina.

5.2.3. Razón de cadenas livianas libres: mide las cadenas livianas libres en sangre, es decir, las que no se encuentran unidas a cadena pesada; las cuantifica y determina la razón entre la cadena comprometida y la no comprometida. Es más sensible que las dos técnicas anteriores y tiene rol pronóstico además de ser útil para el seguimiento de los pacientes con MM de cadenas livianas.

5.3. Confirmación diagnóstica: estudio de médula ósea. El mielograma, correspondiente a un frotis de médula ósea, permite evaluar las características citológicas de la MO. En mieloma múltiple se observa más de 10% de células plasmáticas, que habitualmente tienen morfología patológica (Figura 31-11). Además, la citometría de flujo permite determinar el inmunofenotipo de estas células y determinar su carácter clonal. Por otra parte, es de utilidad realizar algunos estudios citogenéticos para estratificar pronóstico. Por último, la biopsia de médula ósea evalúa la histología y arquitectura medular.

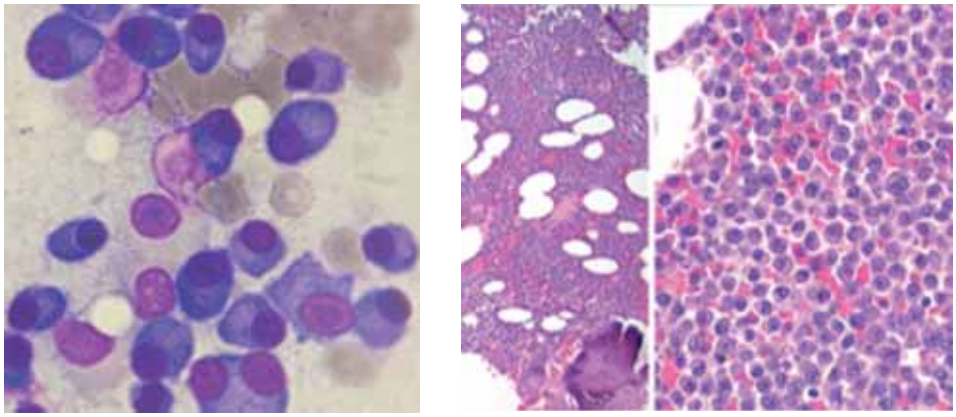


Figura 31-11. Infiltración de médula ósea por células plasmáticas en mieloma múltiple. A la izquierda mielograma (Laboratorio Hematología. P. Universidad católica de Chile) y a la derecha biopsia de médula ósea (Munshi NC. Hoffman Hematology, 2018(7);1381-418).

5.4. Criterios diagnósticos de GM y MM

El MM requiere como criterio obligatorio la detección de más de 10% de células plasmáticas clonales en MO o una biopsia de un tumor que confirme un plasmocitoma, asociado a complicaciones como presencia de CRAB u otras alteraciones de alto riesgo, como razón de cadenas livianas sobre 100, más de 60% células plasmáticas en MO, o más de 1 lesión focal en RNM (Tabla 31-1).

El mieloma quiescente es una condición intermedia que posee carga tumoral, es decir, las células plasmáticas se encuentran entre 10 y 60% o la cuantía del componente monoclonal es elevada, pero aún no desarrolla CRAB ni otras alteraciones definitorias de MM.

Finalmente, en el GMSI hay menos de 10% de células plasmáticas en MO, el componente monoclonal es pequeño y no hay CRAB.

Diagnóstico	Criterios
Mieloma múltiple (1 + a y/o b)	1.- Células plasmáticas médula ósea >10% o Plasmocitoma probado por biopsia a) CRAB b) Razón cadenas livianas >100, células plasmáticas >60%, >1 lesión focal en RM
Mieloma quiescente (SMM) (1,2)	1.- Células plasmáticas médula ósea 10%-60% o Componente monoclonal >3 g/dL en sangre o 500 mg/dL en orina 2.- Sin CRAB
GMSI (MGUS) (1,2,3)	1.- Células plasmáticas médula ósea < 10% 2.- Componente monoclonal < 3 g/dL 3.- Sin CRAB

Tabla 31-1. Criterios diagnósticos de MM, SMM y GMSI (IMWG 2014).

6. PRONÓSTICO

El MM sin tratamiento conlleva un gran impacto en la calidad de vida y una alta tasa de secuelas que suelen ser invalidantes, especialmente por la enfermedad ósea, además de una alta letalidad.

Con tratamiento hay una mejoría en los síntomas, en la calidad de vida y un aumento en la sobrevida.

Al menos hasta la actualidad, el MM aún no es curable. Pese a ello, su pronóstico claramente ha ido en mejoría. En la figura 31-12 se puede observar que en los años 60 la mediana de sobrevida no superaba los 2 años; en la década del 2000 se empezaba a acercar a los 5 años, mientras que en la actualidad se acerca a los 8-10 años. Esto ocurre porque el avance en cuanto a terapias ha sido notable en las últimas décadas, con disponibilidad de tratamientos nuevos, mejor tolerados y que tienen un impacto muy importante en mejorar el pronóstico de esta enfermedad.

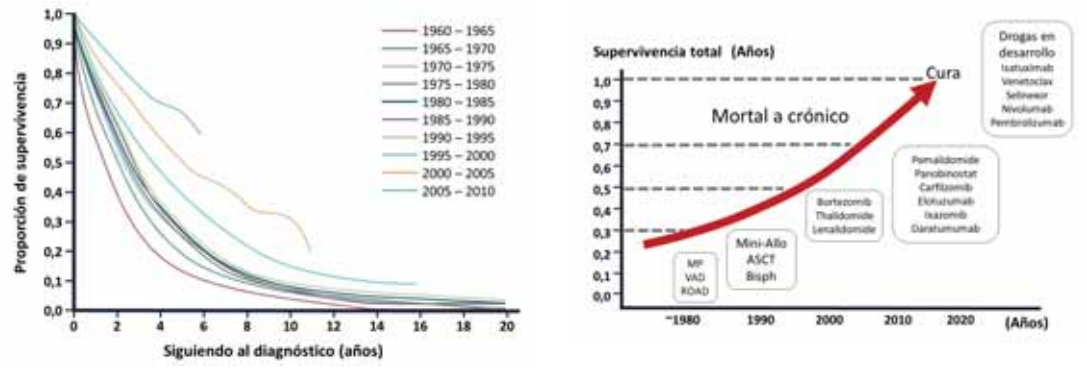


Figura 31-12. Pronóstico del MM a lo largo del tiempo. A la izquierda, aumento progresivo de la mediana de sobrevida global (Clin Cancer Res 2016;22(22):5419-27); a la derecha, impacto de algunas terapias responsables de ello (Int J Hematol 2020;111:512-8).

6.1. Estratificación de riesgo:

No todos los pacientes con MM tienen el mismo pronóstico. En la actualidad, los elementos que más se utilizan para estratificar el riesgo son los niveles de albúmina, B2 microglobulina, LDH y la citogenética. Existen índices pronósticos, como R-ISS, que incorporan estos factores y permiten predecir sobrevida. Sin embargo, otros factores como la edad, el estado funcional, la presencia de enfermedad extramedular, entre otros, también son muy relevantes. Antiguamente se consideraban otros factores, como el grado de las alteraciones del CRAB o la cantidad del componente monoclonal, aunque su correlación con sobrevida es baja por lo que se encuentran en desuso.

7. TRATAMIENTO

7.1. ¿Cuándo tratar a un paciente con Gammapatía Monoclonal?

Los pacientes con GMSI no requieren tratamiento. Solo requieren seguimiento, en general cada 6 meses, para evaluar progresión a MM.

El Mieloma quiescente en general tampoco se trata, pero su seguimiento debe ser más frecuente, por ejemplo, cada 3 meses. Sin embargo, es cada vez más aceptado que existe un subgrupo de pacientes con esta condición que posee un alto riesgo de progresión a MM, y existe evidencia de que el tratamiento precoz en dicho subgrupo puede prevenir la progresión.

El MM activo, por su parte, siempre debe ser tratado, tanto para evitar o manejar las complicaciones como para aumentar la sobrevida. El curso clínico habitual se encuentra graficado en la figura 31-13. Inicialmente el paciente es asintomático, luego requiere un tratamiento que en general logra controlar la enfermedad por un tiempo. Sin embargo, en algún momento la enfermedad recae y se deben

realizar distintos tratamientos, hasta que finalmente la enfermedad se torna resistente o refractaria a las terapias disponibles.

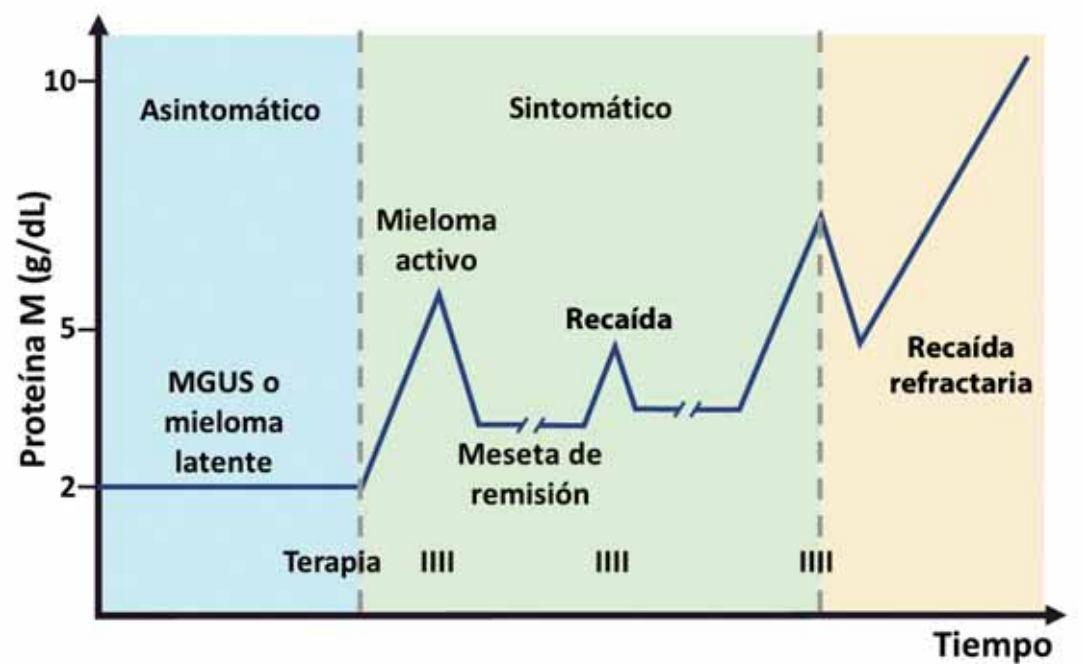


Figura 31-13. Evolución habitual del MM. Durie BGM. International Myeloma Foundation, 2018.

7.2. Tratamiento general

El MM se encuentra incluido en el plan AUGE/GES desde el año 2019, por lo que debe realizarse la notificación y derivación correspondiente (de carácter obligatorio).

7.2.1. Prevención y manejo de la enfermedad ósea

- Bisfosfonatos (Figura 31-14): Pilar fundamental del manejo, indicados en todos los pacientes con MM que requieran tratamiento, aunque no tengan lesiones óseas. Disminuyen los eventos óseos, las fracturas y mejoran el dolor. Podrían incluso aumentar tasa de respuesta y sobrevida. En pacientes que no puedan utilizarlos, se puede utilizar denosumab.
- Analgesia: fundamental en el manejo de síntomas, con paracetamol y opiáceos en caso de dolor intenso. Evitar uso prolongado de AINEs por riesgo de falla renal.
- Radioterapia: en caso de lesiones óseas con riesgo de daño orgánico o lesiones inestables.
- Cirugía de estabilización: puede ser mínimamente invasiva.

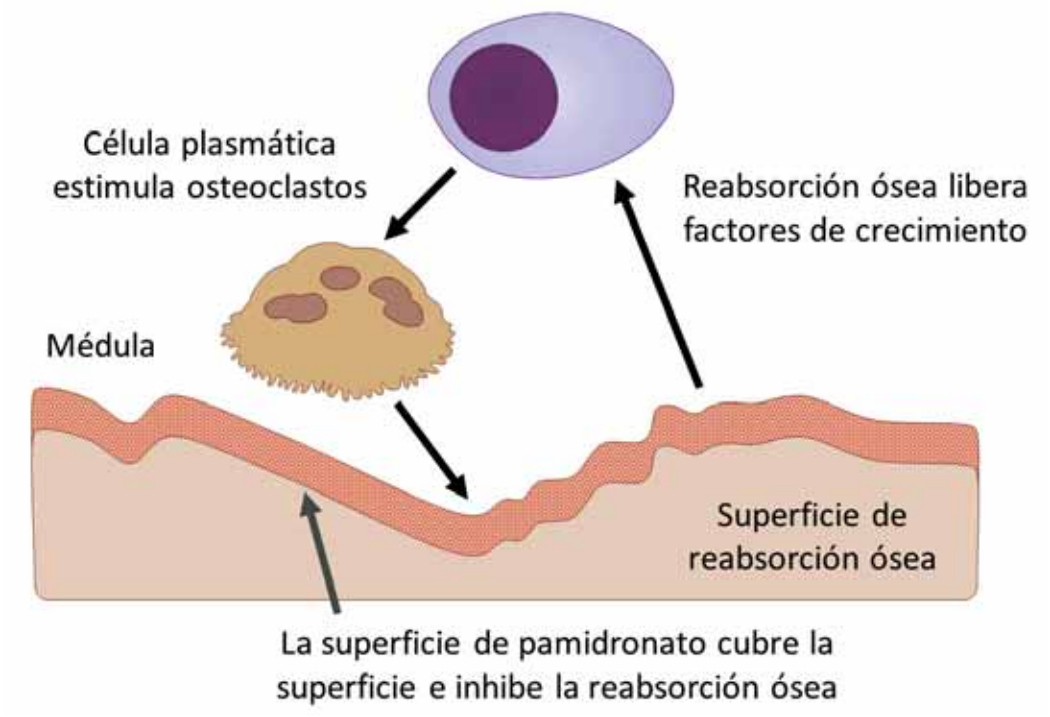


Figura 31-14. Mecanismo de acción de los bisfosfonatos. Durie BGM. International Myeloma Foundation, 2018

7.2.2 Manejo de otras complicaciones

En el caso de la anemia, el tratamiento del MM habitualmente logra su mejoría. Sin embargo, si se detectan deficiencias (por ejemplo de hierro) estas deben ser suplementadas. Algunos pacientes requieren soporte transfusional, uso de eritropoyetina, entre otras medidas.

En el caso de la insuficiencia renal, es fundamental mantener una adecuada hidratación y evitar nefrotóxicos. El uso de corticoides puede ayudar a evitar progresión del daño e incluso revertirlo, especialmente en agudo. Muchos pacientes requieren terapia de reemplazo renal como diálisis.

El manejo de la hipercalcemia se basa en hidratación, bifosfonatos y corticoides.

7.2.3 Profilaxis

Existen 2 complicaciones muy relevantes de ser prevenidas. En primer lugar, el riesgo de infecciones aumenta tanto por la inmunoparesia como por el tratamiento. Por lo tanto, los pacientes deben recibir vacunas y se deben utilizar antibióticos y/o antivirales profilácticos. Algunos casos pueden beneficiarse de la administración de inmunoglobulina. En segundo lugar, el riesgo trombótico es elevado,

especialmente en contexto de algunos tratamientos específicos, por lo que debe privilegiarse una movilización adecuada y la mayoría de los pacientes requieren de profilaxis antitrombótica o incluso de anticoagulación en dosis terapéutica.

7.3. Tratamiento especifico

Los objetivos del tratamiento específico son progresivos:
- Controlar y revertir las complicaciones, mejorando la calidad de vida
- Disminuir e idealmente erradicar la proteína monoclonal
- Erradicar el clon de células plasmáticas que la produce, idealmente eliminando completamente la enfermedad mínima residual
- Retrasar la recaída
- Aumentar la sobrevida

Las drogas que se utilizan para el tratamiento del MM son múltiples. Dentro de ellas encontramos corticoides, alquilantes (melfalán, ciclofosfamida), inmunomoduladores (lenalidomida, talidomida, pomalidomida), inhibidores de proteasoma (bortezomib, carfilzomib), anticuerpos monoclonales (daratumumab), entre otros grupos de fármacos. A medida que transcurre el tiempo, el arsenal terapéutico aumenta considerablemente.

El tratamiento en general es combinado con al menos dos o tres fármacos, es prolongado e individualizado según las características del paciente y el riesgo de su enfermedad.

El esquema de manejo, a muy grandes rasgos, se grafica en la figura 31-15. Se realiza un tratamiento inicial para controlar la enfermedad y luego, en los pacientes que son candidatos (considerando una serie de factores como estado funcional, comorbilidades, edad), se realiza un trasplante autólogo de médula ósea. Hoy en día, una proporción importante de los pacientes son candidatos a trasplante, incluso a edades tan avanzadas como 75 años. Posteriormente, luego de haber logrado idealmente la mejor respuesta posible, se realiza mantenimiento con una o dos drogas en dosis bajas, lo que prolonga la respuesta y puede mantener al paciente libre de enfermedad por un tiempo prolongado. Sin embargo, en algún momento ocurre recaída y esta debe ser manejada con un cambio de terapia. Por lo tanto, si bien hay fases más intensas, el tratamiento es en general continuo.

Es muy importante realizar un seguimiento adecuado de la enfermedad, que se realiza con los exámenes generales ya mencionados, los niveles de paraproteína y la evolución clínica.

Figura 31-15. Esquema general de tratamiento del paciente con mieloma múltiple.

8. OTRAS GAMMAPATÍAS MONOCLONALES

Es relevante mencionar otras gammapatías monoclonales, menos frecuentes, que poseen manifestaciones clínicas y tratamientos distintos:

- Amiloidosis AL: ocurre por un mal plegamiento de la proteína monoclonal, la cual se deposita en distintos órganos comprometiendo su función. Afecta especialmente a corazón, riñones, grasa subcutánea, tracto gastrointestinal y sistema nervioso periférico.

- Macroglobulinemia de Waldenström: linfoma linfoplasmocítico que secreta una proteína monoclonal de tipo IgM. Esta proteína pentameriza y puede provocar manifestaciones clínicas de hiperviscosidad.

- Plasmocitoma solitario: tumor de células plasmáticas en ausencia de infiltración de médula ósea y de CRAB. Puede ser óseo o extraóseo. Su pronóstico es mejor que el MM y responde bien a la radioterapia. Puede progresar a MM.

- Síndrome de POEMS: caracterizado por polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, presencia de un componente monoclonal y alteraciones cutáneas.

- Leucemia de células plasmáticas: espectro más agresivo de mieloma múltiple, caracterizada por la presencia de más de 20% y más de 2000 células plasmáticas en sangre. Esta definición posiblemente sea modificada en un futuro a más de 5% de CP circulantes. Altísima mortalidad, requiere tratamiento intensivo.

9. CONCLUSIÓN

La detección de una proteína monoclonal en sangre puede representar desde un hallazgo frecuente y sin impacto clínico hasta un cáncer agresivo que afecta

muy significativamente la calidad de vida y la sobrevida. Por lo tanto, es fundamental conocer las distintas entidades de gammapatía monoclonal, mantener un índice de sospecha elevado y saber realizar un enfrentamiento diagnóstico ordenado. La detección adecuada y el tratamiento oportuno pueden evitar las complicaciones y aumentar la sobrevida.

10. LECTURAS RECOMENDADAS

Abbas AK. Cellular and molecular immunology, 9th ed. Elsevier; 2018.

Hillengass J, Usmani S, Rajkumar SV, Durie BGM, Mateos MV, Lonial S, et al. International myeloma working group consensus recommendations on imaging in monoclonal plasma cell disorders. Lancet Oncol. 2019;20(6):e302-e312.

Kumar SK, Rajkumar SV, Kyle RA, van Duin M, Sonneveld P, Mateos MV, et al. Multiple myeloma. Nat Rev Dis Primers. 2017;3:17046.

Kyle RA, San-Miguel JF, Mateos MV, Rajkumar SV. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma. Hematol Oncol Clin North Am. 2014;28(5):775-790.

Ocqueteau M, Orfao A, Almeida J, Bladé J, González M, García-Sanz R, et al. Immunophenotypic characterization of plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance patients. Implications for the differential diagnosis between MGUS and multiple myeloma. Am J Pathol. 1998;152(6):1655-1665.

Ocqueteau M, Orfao A, García-Sanz R, Almeida J, González M, San Miguel JF. Expression of the CD117 antigen (c-Kit) on normal and myelomatous plasma cells. Br J Haematol. 1996;95(3):489-493.

Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos MV, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. Lancet Oncol. 2014;15(12):e538-e548.

Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2020 update on diagnosis, risk-stratification and management. Am J Hematol. 2020;95(5):548-567.

San Miguel JF. Gammapatías monoclonales. Hematología: Manual básico razonado, cuarta edición. España: Elsevier; 2015:163-173.

Sarmiento M, Lira P, Ocqueteau M, Rodríguez MA, García MJ, Jara V, et al. Autologous hematopoietic cell transplantation in patients with multiple myeloma. Experience in 53 patients. Rev Med Chil. 2014;142(12):1497-1501.

Sarmiento M, Ramírez P, Parody R, Salas MQ, Beffermann N, Jara V, et al. Advantages of non-cryopreserved autologous hematopoietic stem cell transplantation against a cryopreserved strategy. Bone Marrow Transplant. 2018;53(8):960-966.

Terpos E, Zamagni E, Lentzsch S, Drake MT, García-Sanz R, Abildgaard N, et al. Treatment of multiple myeloma-related bone disease: recommendations from the Bone Working Group of the International Myeloma Working Group. Lancet Oncol. 2021;22(3):e119-e130.

Capítulo

32

LINFOMAS

Nicolás Triantafilo C., Mauricio Ocqueteau T.

Resumen

1. **Introducción**
2. **Clasificación**
3. **Etiopatogenia**
4. **Presentación**
5. **Estudios de Orientación**
6. **Diagnóstico**
7. **Etapificación**
   a. Imagen
   b. Biopsia de Médula ósea
   c. Punción Lumbar

8. Conceptos Generales

9. Linfomas Indolentes B
- a. Linfoma folicular
- b. Linfoma de zona marginal
- c. Linfoma Linfoplasmocítico
- d. Leucemia de células velludas

10. Linfomas Agresivos B
- a. Linfoma Difuso
- b. Linfoma de Burkitt
- c. Linfoma del Manto

11. Linfomas T
- a. Linfomas T Periféricos
- b. Linfomas T Cutáneos

12. Linfoma de Hodgkin

13. Lecturas sugeridas

RESUMEN

Los linfomas corresponden a las neoplasias hematológicas más frecuentes. Desde la última edición de este libro a la fecha han existido grandes avances que han permitido una mejor comprensión de su biología y comportamiento. Esto se ha traducido en una mejor clasificación de los distintos tipos de linfomas, un mejor abordaje diagnóstico y terapias más seleccionadas. La separación entre linfoma de Hodgkin y no Hodgkin y de linfomas agresivos e indolentes aún es útil como aproximación inicial de los enfermos y les permite, tanto a ellos como a nosotros (los clínicos), un entendimiento global del comportamiento. Los esquemas RCHOP (en linfomas B), ABVD (en linfoma de hodgkin) y CHOP (en linfomas T) continúan siendo pilares fundamentales del tratamiento de primera línea de estas enfermedades, pero los buenos resultados de nuevas terapias en recaídas han hecho que muchas de ellas ya se estén incorporando en una primera instancia. El pronóstico de los linfomas es variable y depende del tipo y de otras variables clínicas y genéticas. Aunque la etapificación está en todas las escalas pronósticas, no suele jugar un rol mayor en el ofrecimiento de terapia, dado que muchos de ellos, incluso etapas avanzadas, pueden tratarse con muy buenos resultados.

1. INTRODUCCIÓN

Históricamente los trastornos derivados de las células linfoides se clasificaban según su comportamiento en agudo o crónico y según el tipo de compromiso en leucémico (células circulantes) o nodal (ganglionar). Hoy en día se entiende por linfomas a un grupo heterogéneo de neoplasias que se originan desde un linfocito maduro, sea de estirpe B, T o NK (Natural Killer), independiente de su forma de presentación.

Los linfomas corresponden aproximadamente al 5% de los cánceres y son las neoplasias hematológicas más frecuentes. Su incidencia ha ido en aumento y la causa no es del todo clara; sin embargo, no sería explicable solo por el aumento de la esperanza de vida. El pronóstico de los linfomas es extremadamente variable y depende del tipo de linfoma, el grado de avance de la enfermedad y la condición clínica del paciente. Con los años, gracias al análisis genómico de los linfomas, se han podido identificar nuevos factores que no solo tienen importancia pronóstica, sino que además han llevado al desarrollo de nuevas terapias dirigidas.

2. CLASIFICACIÓN

La actualización de OMS del 2016 clasifica a los distintos linfomas según criterios inmunohistoquímicos, morfológicos y genéticos, logrando con ello definir y diferenciar de mejor forma entidades que en clasificaciones anteriores se superponían y que hoy se sitúan dentro de 3 grandes categorías: neoplasias maduras de estirpe B, neoplasias maduras de estirpe T y NK y Linfoma o Enfermedad de Hodgkin. Si bien la OMS no subclasifica los linfomas según agresividad, es de uso común en la práctica clínica y también, incluso, en ensayos clínicos, la agrupación de los linfomas en 2 categorías: Linfomas Agresivos o de alto grado y linfomas indolentes o de bajo grado. El linfoma de hodgkin, a pesar de seguir el patrón de un linfoma agresivo en la mayoría de los casos, suele clasificarse aparte. Es necesario entender que esta aproximación no pretende ser una regla para todos los pacientes, sino más bien una ayuda clínica para entender los conceptos generales de la clínica, el tratamiento y el pronóstico.

3. ETIOPATOGENIA

El modelo actual considera que los linfomas representan transformaciones malignas de diferentes etapas madurativas de los linfocitos. Aunque para algunos tipos de linfoma la célula de origen es clara y logra tener sustento en estudios de secuenciación genómica, para otros es menos claro y de momento, teórico. Al igual que otros cánceres, su desarrollo involucra numerosas alteraciones genéticas que afectan a genes supresores de tumores, oncogenes y también al estroma. La adquisición de características malignas pueden ocurrir por medio de traslocaciones cromosómicas balanceadas, traslocaciones no balanceadas, mutaciones somáticas puntuales o alteraciones epigenéticas. Las translocaciones balanceadas son elementos característicos de los linfomas y explican, en parte, el desarrollo de varios tipos de ellos. Estas traslocaciones interponen genes junto a las regiones promotoras de los genes de la cadenas pesada (en el cromosoma 14) o livianas (en los cromosoma 2 -cadena kappa- y 22 -cadena lambda) de inmunoglobulinas (Ig), generando con esto que la expresión constitutiva y vital de esta, transcriba a su vez genes aberrantes. Ejemplos importantes de estas traslocaciones son la t(14;18) en el linfoma folicular, que interpone al gen de BCL-2 (anti apoptótico) junto a la cadena pesada de Ig; la t(11;14) en el linfoma del manto que interpone al gen de ciclina D1 (CCND1) junto al de la cadena pesada y las t(8;14), t(2;8), t(8;22) en el linfoma de Burkitt que interponen el gen c-Myc (gen de proliferación) junto a la cadena pesada, cadena liviana kappa y cadena liviana lambda respectivamente.

Distintos virus con potencial oncogénico también pueden jugar un rol importante en el desarrollo de linfomas. El virus Epstein barr (EBV), el HTLV-1 y el HHV-8 por medio de distintos mecanismos insertan su material genético en el genoma de células sanas, promoviendo el crecimiento celular, la transcripción de proteí-

nas virales y la activación de oncogenes. El EBV puede estar presente en varios tipos de linfomas, pero se relaciona de forma más estrecha con la patogenia del Linfoma de Burkitt endémico, el linfoma NK y linfomas asociados a inmunosupresión. El HTLV-1 está presente en el 100% de los casos de linfoma/leucemia T del adulto (ATLL) y define a esta entidad. El VIH por su parte no actúa directamente insertando oncogenes, sino más bien promueve la linfomagenesis por medio de la pérdida de la inmunovigilancia.

La maduración de los linfocitos B se inicia en la médula ósea por medio del reordenamiento VDJ que da origen finalmente a BCR maduros con expresión de IgM e IgD kappa en la superficie de linfocitos "naive". Estos linfocitos circulan por la sangre y tejidos linfoides secundarios a la espera de su interacción con un antígeno. La activación del linfocito B "naive" puede ocurrir de forma directa por el antígeno (linfocitos marginales) o por medio de linfocitos T CD4 y células presentadores de antígeno (linfocitos foliculares). La primera dará origen a una respuesta rápida (horas) y creación de células plasmáticas de vida media corta con anticuerpos de baja afinidad. La segunda dará lugar a respuestas específicas, pero más lentas (5–7 días) y desarrollará células plasmáticas de larga duración con producción de anticuerpos de alta afinidad. El bazo y el tejido linfoide asociado a mucosas están expuestos a una gran carga antigénica proveniente del intestino y es por esto que en estos órganos son frecuentes los linfocitos marginales de respuesta rápida que conforman una zona marginal propiamente tal. Esta zona está prácticamente ausente en linfonodos no mesentéricos y explica por ende la baja frecuencia de linfomas marginales nodales puros. Por otro lado los linfocitos activados por antígeno dependiente de linfocitos T migran de los folículos primarios e inician la conformación de folículos secundarios o centros germinales, desplazando los linfocitos no activados hacia la periferia para conformar la denominada zona del manto. Esta proliferación inicial de linfocitos B activados está ligada a la expresión de c-MYC, pero rápidamente se "apaga" al conformarse la zona oscura por medio del aumento de BCL-6. Este gen es el gran regulador del centro germinal dado que mantiene un fino equilibrio que en pro de la generación de diversidad, permite e incentiva el desarrollo de mutaciones y cortes de hebras sin inducir señalizaciones de muerte celular, pero por otro lado, sin permitir el desarrollo de tumores. Este equilibrio lo logra por medio de la supresión tanto de oncogenes, como BCL-2 (anti apoptótico) y c-Myc (promotor de proliferación), como de supresores tumorales, como TP53 y CDKN1A entre otros. BCL-6 a su vez mantiene a la células dentro del centro germinal impidiendo la progresión prematura fuera de este y la formación consiguiente de linfocitos B de memoria y células plasmáticas. Una vez generada la hipermutación somática y el cambio de clase, los linfocitos (centrocitos ahora) proceden desde la zona oscura a la zona clara para probar su afinidad ante células T foliculares y definir aquellas que puedan progresar hacia linfocito B de memoria y células plasmáticas. La expresión aberrante de c-MYC, BCL2 y desregulaciones de BCL6 por medio de translocaciones no balanceadas o mu-

taciones somáticas en este ambiente "permisivo" del centro germinal, explican el desarrollo de varios linfomas B y en cierta parte, explican la mayor frecuencia de linfomas de centro germinal; linfoma de Burkitt y Linfoma difuso de células grandes B (LDCGB) proveniente de centroblastos (zona oscura) y el linfoma folicular desde centrocitos (zona clara). Posteriormente niveles altos de Factor Nuclear Kappa B (NF-kB), IRF4/MUM1 y BLIMP1 apagan BCL-6 y potencian la diferenciación plasmocitoide. Las células de origen de los distintos linfomas B se presentan en la figura 32-1.

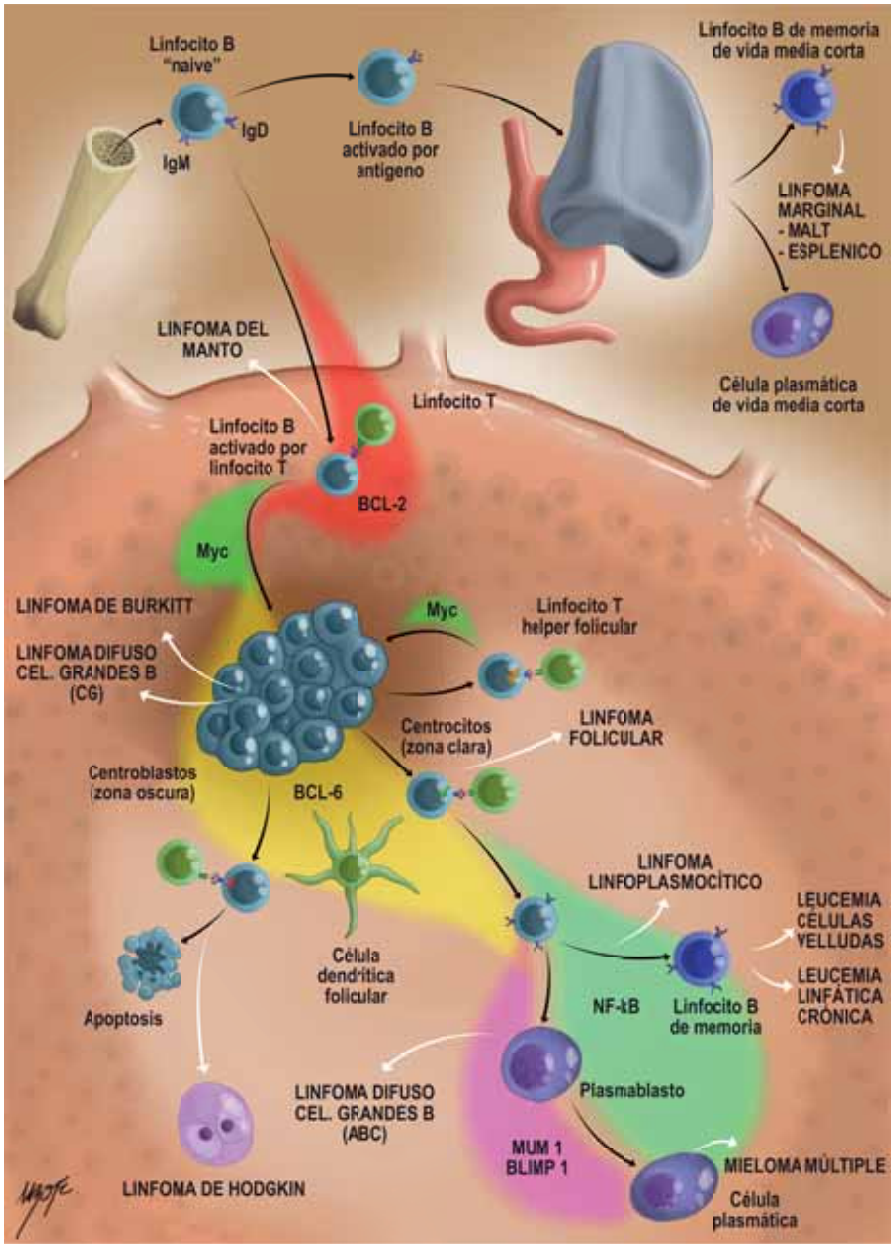


Figura 32-1. Linfomagénesis B

La célula de origen en el linfoma de Hodgkin no es del todo clara, pero debido a la presencia de hipermutación somática, se ha logrado establecer en linfocitos B de centro germinal. La ausencia de antígenos B y del BCR (vital para la supervivencia del linfocito B) hacen pensar que la célula de Reed Stenberg (RS) es una célula que se ha rescatado de la apoptosis por medio de múltiples vías de activación (NF-kB y JAK/STAT entre otros). En el linfoma de Hodgkin resulta aún más interesante el hecho de que la célula de RS no sea atacada por el abundante número de células inmunes que la rodean. Este reclutamiento de células inmunes se produce por la secreción autocrina y paracrina de múltiples mediadores e interleucinas desde la propia célula de RS. Hoy se sabe que la célula de RS (y muchas otras células tumorales) es hábil para no ser reconocida ni atacada por el sistema inmune. Las 2 vías más importantes son la pérdida de expresión del Complejo de Histocompatibilidad Mayor (MHC), necesario para el reconocimiento por linfocitos T, y la alta expresión de PD-L1 y PD-L2 que al hacer contacto con PD-1 en linfocitos T bloquean su proliferación y lo llevan hacia un fenotipo "exhausto".

La maduración de los linfocitos T ocurre principalmente en el timo. Al igual que los linfocitos B, los linfocitos T también deben realizar reordenamiento y maduración de su receptor de reconocimiento TCR. Esta recombinación VDJ involucra cuatro genes del TCR, alpha (α), beta (β), gamma (γ) y delta (δ). Los linfocitos maduros o post tímicos expresan mayoritariamente el fenotipo TCRαβ (más del 90%) y en menor proporción el fenotipo TCRγδ. El primero reconoce antígenos presentados exclusivamente por medio de MHC, mientras que el segundo no requiere la sensibilización por medio de antígenos para activarse y por lo tanto, actúa similar a las células natural killer (NK) como parte de la inmunidad innata. Dentro de la maduración tímica, el TCRαβ adquiere además la expresión de CD3 y la expresión de CD4 o CD8, determinando rápidamente los subtipos Helper (Th) y citotóxico (Tc). Posteriormente los linfocitos CD4+ (Th), debido a la acción de distintas interlukinas, se diferencian hacia otros efectores como Th1, Th2, Th17 y T helper folicular (Tfh) entre otros. Esta plasticidad celular, la baja prevalencia de linfomas T y la interferencia de linfocitos T reactivos han hecho que el modelo de célula de origen sea de difícil aplicación. Aun así, por medio de perfiles de expresión génica y factores de transcripción asociados, se ha podido hipotetizar sobre la célula de origen en algunos tipos de Linfomas no Hodgkin T (LNH T). Es así, por ejemplo, como se puede hacer un paralelo entre los LNH T expresores de GATA3 y los linfocitos Th2 y los LNH T expresores de TBX21 y linfocitos Th1. Un origen más claro es el que se ha establecido en el linfoma angioinmunoblástico (AITL) y en el LNH T de fenotipo Tfh. En estos casos la fuerte señal del TCR, el perfil de expresión génica y la marcación IHQ de CD10, BCL6 y CXCL13 entre otros, relacionan el origen a los linfocitos T helper del centro germinal (Tfh). La asociación entre otros LNH T y su célula de origen requiere de mayor estudio.

4. PRESENTACIÓN

La presentación clínica depende del tipo de linfoma y su agresividad. El crecimiento nodal sostenido o progresivo, característicamente indoloro y sin alteración de la piel circundante, es la principal manifestación de todos los linfomas, pero la velocidad de crecimiento, la presencia de síntomas B (baja de peso > 10% en los últimos 6 meses, sudoración nocturna profusa y fiebre sostenidas sin causa inflamatoria/infecciosa demostrable), la LDH aumentada y las masas mediastínicas orientan a linfomas agresivos y/o de alta masa tumoral y por lo tanto obligan a acelerar el proceso diagnóstico y terapéutico. Por otro lado, la presencia de citopenias, linfocitosis, esplenomegalia y múltiples adenopatías supra e infra diafragmáticas de pequeño tamaño en un paciente asintomático orientan a linfomas de comportamiento indolente (Figura 32-2).

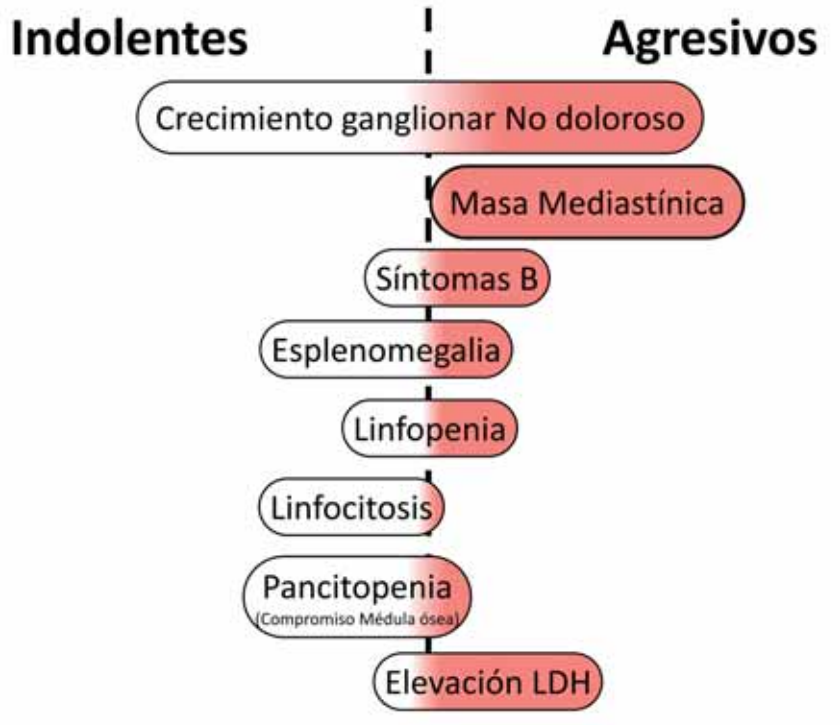


Figura 32-2. Comparación clínica entre linfomas indolentes y agresivos

5. ESTUDIO DE LABORATORIO:

El estudio de laboratorio de los pacientes debe incluir exámenes de sangre por diversos motivos.

- Pesquisa de Urgencias oncológicas: Síndrome de lisis tumoral, hipercalcemia maligna y citopenias profundas. Para esto es necesario contar con LDH, Ácido úrico, Fósforo, Potasio, creatinina, calcio y un hemograma.

- Orientación: Aunque la alteración del hemograma más frecuente (pero poco específica) en linfomas es la linfopenia, el hemograma nos ayuda también a detectar variantes leucémicas (Leucemia linfocítica crónica, variante de Linfoma de Células del Manto, Leucemia de células grandes granulares T y Leucemia de Células Velludas) como también para pensar en compromiso de médula ósea. La hipercalcemia asociado a LDH elevada no es frecuente en linfomas y junto con un hemograma que describa células en hoja de trébol es altamente indicativo de una leucemia linfoma T del adulto (ATLL).
- Ajuste de Tratamiento: La gran mayoría de los tratamientos oncológicos requiere ajuste por función renal y/o hepática, por lo que resulta importante contar con una creatinina y bilirrubina. Dado que la mayoría de los linfomas son de estirpe B y por lo tanto, expresores de CD20 en su membrana, es importante descartar la infección por VHB con antígeno de superficie de VHB y con un anticore total, para prevenir una reactivación de este virus bajo el tratamiento con anticuerpos anti CD20, como veremos más adelante (por ejemplo, Rituximab).
- Pronóstico: Existen variadas escalas pronósticas para los distintos tipos de linfomas, basados en información clínica y datos de laboratorio como albúmina, VHS, B2- microglobulina y LDH, entre otros. La solicitud de Elisa de VIH debe ser de rutina, dado la asociación existente y la importancia de un inicio precoz de terapia antirretroviral.

6. DIAGNÓSTICO

Existen diversos medios para aproximarse al diagnóstico de los linfomas; sin embargo, el examen de excelencia continúa siendo la biopsia excisional del tejido linfoide involucrado. El informe de la biopsia debe incluir la morfología (arquitectura), patrón de infiltración y de manera imperativa el análisis inmunohistoquímico (Tabla 1). El grado de replicación expresado por medio del marcador Ki67 es útil también como indicador de la agresividad del tumor. Habitualmente los linfomas indolentes presentan Ki67 <30%, mientras que las variantes agresivas suelen tener expresión sobre el 70-80%. En algunos casos el compromiso adenopático es profundo o extremadamente grande, siendo necesario acceder al diagnóstico a través de una biopsia por punción bajo tomografía computada (TAC) o ecografía. Es importante destacar que la biopsia por punción es probablemente la mejor alternativa en pacientes con masas mediastínicas de gran tamaño, ya que evita el riesgo potencial de colapso circulatorio asociado a anestesias generales con bloqueo neuromuscular.

El diagnóstico por medio de la biopsia de médula ósea no es generalizable, dado que el compromiso de médula ósea es variable según el tipo de linfoma y su etapa. Sin embargo, este procedimiento es una estrategia de alto rendimiento en pacientes con pancitopenia, linfocitosis y esplenomegalia, en donde se presume el compromiso medular por un linfoma indolente (linfoma marginal esplénico, leucemia de células velludas o un linfoma de células del manto). Por

otro lado, la ausencia de baja de peso, adenopatías infradiafragmáticas, trombocitopenia, anemia y compromiso hepatoesplénico hace improbable el compromiso de médula ósea (< 5 % de los casos).

La citometría de flujo ha colaborado en las últimas décadas como un complemento directo para el diagnóstico de síndromes linfoproliferativos tanto por su versatilidad (realizable en muestras de tejido, sangre, líquido cerebro raquídeo y exudados corporales), como por la rapidez con la que ofrece sus resultados. Se rige por el mismo principio diagnóstico de la inmunohistoquímica, que es la identificación de grupos celulares patológicos por medio del análisis de la expresión de distintos marcadores celulares (Cluster de diferenciación; CD) (Tabla 32-1), con una alta sensibilidad y especificidad.

Tabla 32-1: Inmunohistoquímica según tipo de Linfoma

	Línea B								Línea T						
	CD19	CD20	CD79a	CD10	BCL6	BCL2	CD23	CD200	CD3	CD4	CD8	CD2	CD7	CD5	CD56
LDCGB	+	+	+	+, (-) en ABC	+	+/-									
Folicular	+	+	+	+	+	+									
Burkitt	+	+	+	+	+										
Manto	+	+	+											+	
LLC	+	+	+				+	+						+	
Marginal	+	+	+												
LNTNOS									+	+		+			
AITL				+	+				+	+		+			
NK									+ (citoplasmático)						+

LDCGB, Linfoma difuso de células grandes B; LC, Leucemia linfática crónica; LNTNOS, Linfoma no Hodgkin T No especificado; AITL, Linfoma Angioinmunoblástico; NK, Natural killer.

7. ETAPIFICACIÓN

7.1. Imagen

Los linfomas se clasifican siguiendo la clasificación de Ann Arbor y la modificación de Lugano 2014. La clasificación de Ann Arbor fue propuesta inicialmente para el linfoma de hodgkin, pero posteriormente extendida a todos los linfomas. Las etapas van del I al IV según la extensión del compromiso nodal (figura 32-3) y se agregan letras según distintas características (Síntomas B: B, Enfermedad "abultada" o "Bulky": X, Extranodal: E). Algunas variantes leucémicas como la leucemia linfocítica crónica, la leucemia de células velludas y los linfomas cutáneos no se rigen estrictamente por esta clasificación.

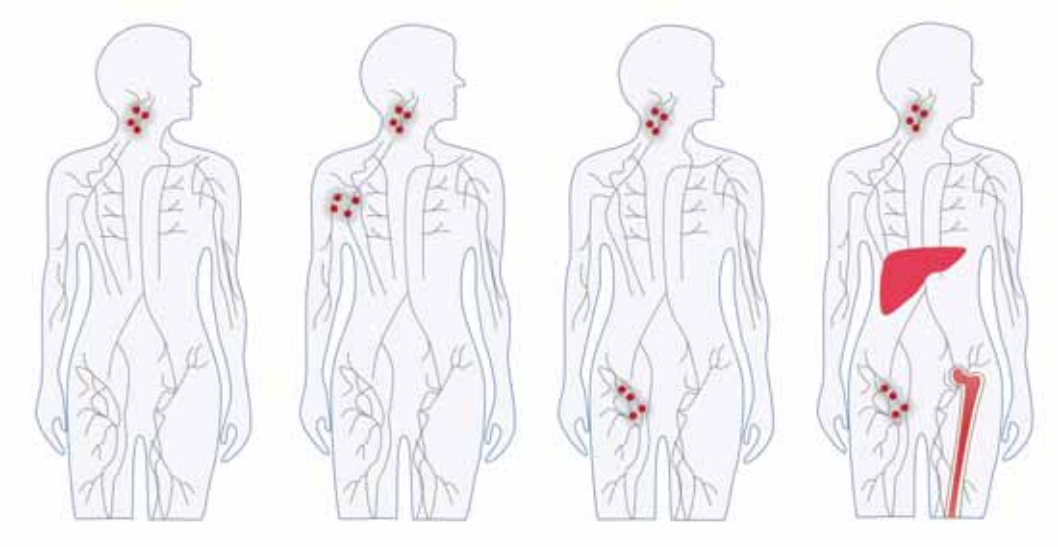


Figura 32-3. Clasificación de etapas de los linfomas (Ann Arbor y modificación de Lugano)

El TAC multicorte ha sido reemplazado en los últimos años por el PET CT con FDG en casi todos los linfomas, dado que facilita la detección de enfermedad, logra subir de etapa de un 10 a 20% de pacientes inicialmente etapificados con TAC y logra establecer compromiso de médula ósea con alta acuciosidad en algunos tipos de linfoma (sobretodo en linfoma de hodgkin). El PET CT, además, funciona como una imagen basal para comparar la evolución de la enfermedad bajo tratamiento por medio del análisis del metabolismo (SUV) de los distintos compromiso tumorales de una forma estandarizada (criterios Deauville - Lugano 2014) y con la posibilidad de detectar cambios rápidos en la viabilidad tumoral. Estos cambios, en muchas situaciones, se producen de forma más precoz que los cambios de tamaño y permiten por tanto, una medición de respuesta más acuciosa. Algunos estudios además, establecen que la intensidad del metabolismo, medido por SUV, permite diferenciar de cierta forma a los linfomas agresivos de indolentes. Si bien

no se ha establecido un punto de corte claro, las variantes agresivas frecuentemente tienen SUV mayores de 12. Esta información debe ser considerada con cautela dado que otros estudios, como el Gallium, han evidenciado que linfomas indolentes, como el linfoma folicular, pueden presentarse con SUV de distinta magnitud.

7.2. Biopsia médula ósea

La biopsia de médula ósea ha sido parte rutinaria de la etapificación; sin embargo, estudios recientes en la era del PET-CT han cuestionado su utilidad. En el linfoma de Hodgkin, de hecho, una revisión sistemática del 2014 estableció una sensibilidad de 96,9% y una especificidad de 99% para el compromiso de médula ósea (AUC curva ROC: 0,98) haciendo con esto que algunas guías internacionales dejen de recomendar el procedimiento en esta enfermedad. En el LDCGB la sensibilidad y especificidad se ha estimado en 88,7% y 99,8% con solo un 3% de pacientes que muestran compromiso por biopsia a pesar de un PET CT negativo. A pesar de esta menor sensibilidad, el impacto en cambio de conducta tras un resultado positivo de la biopsia de médula ósea es dudoso, dado que la gran mayoría de estos pacientes ya es catalogado de etapa avanzada con el PET CT. La sensibilidad y especificidad en linfoma folicular y en LNH T es menor y probablemente aún requiere mayor validación. La duda actual del rol de la biopsia de médula ósea persiste al analizar el resultado al término del tratamiento, ya que en linfoma folicular y en LDCGB con compromiso inicial de médula ósea, solo un 4,5 y un 7,1% de los paciente respectivamente muestran persistencia de compromiso de médula ósea a pesar de un PET CT con respuesta completa. Aunque la omisión de la biopsia de médula ósea en la etapificación no es una recomendación habitual de guías clínicas, impresiona que su realización en la era de PET CT, debe ser analizada juiciosamente y bajo el supuesto de un un posible cambio de conducta terapéutica.

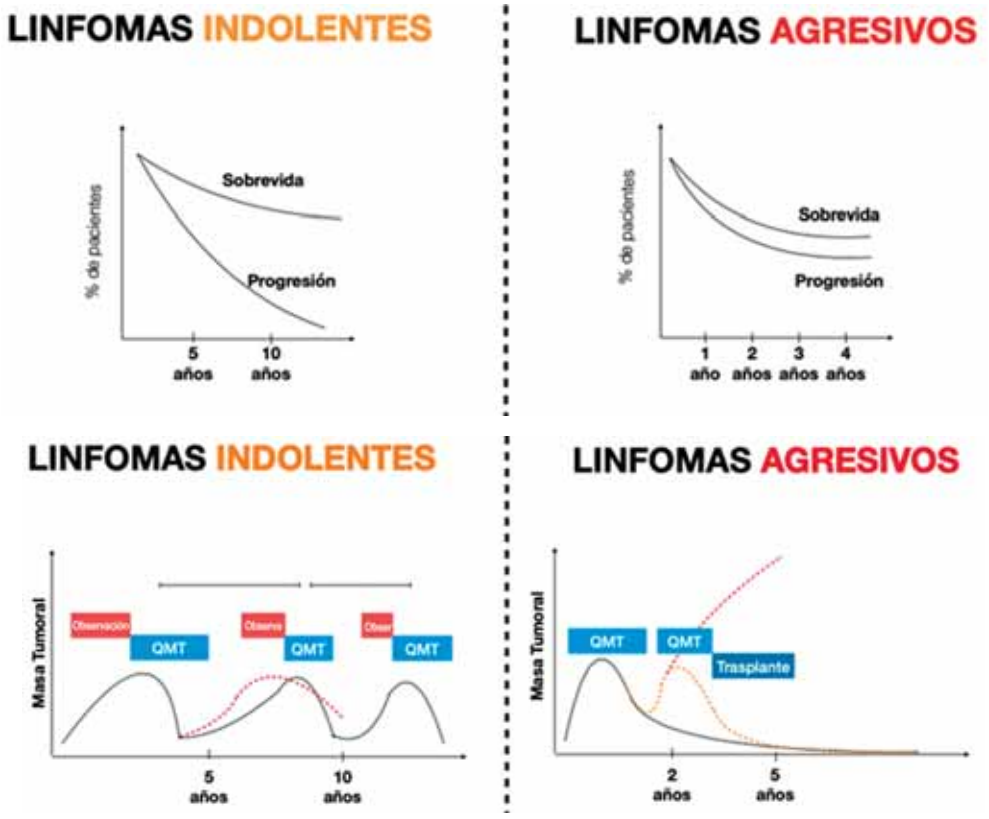
7.3. Punción Lumbar:

La punción lumbar para detectar compromiso de linfoma en el líquido cefalorraquídeo está reservado para pacientes con alto riesgo de compromiso del sistema nervioso central (SNC), como el linfoma de Burkitt, el linfoma difuso de células grandes B con compromiso testicular, el linfoma primario del Sistema nervioso central y otros linfomas agresivos con compromiso próximo a estructuras del SNC. En caso de ser realizada, la muestra debe ser analizada idealmente tanto por citología convencional como por citometría de flujo.

8. CONCEPTOS GENERALES

La división entre linfomas agresivos e indolentes es útil para entender conceptos importantes relativos al manejo y al pronóstico. Los linfomas indolentes por su baja replicación tumoral pueden beneficiarse de amplias ventanas de

observación sin tratamiento y sin que esto perjudique el pronóstico, sobretodo en pacientes mayores o frágiles. Si bien se consideran en términos generales no curables, las respuestas a tratamiento tienden a ser frecuentes y duraderas. El objetivo del tratamiento, por ende, busca prolongar el tiempo hasta la siguiente recaída lo más que se pueda. Los linfomas agresivos, por su parte, por su rápida replicación requieren tratamiento siempre e idealmente de forma precoz. La alta tasa de replicación, por otro lado, implica mayor quimiosensibilidad, lo que se refleja en respuestas frecuentes, usualmente rápidas y con una posibilidad real de curación. El objetivo del tratamiento en este caso entonces, es la curación (figura 32-4).



Líneas rojas punteadas: recaídas. QMT: Quimioterapia

Figura 32-4. Representación gráfica del comportamiento clínico de linfomas indolentes y agresivos. A) Curvas de sobrevida y progresión (En pacientes con linfoma indolente la curva progresión no determina necesariamente un impacto inmediato en la sobrevida, dado que las recaídas pueden tratarse con buena respuesta. Por el contrario, en pacientes con linfomas agresivos, las recaídas, que habitualmente ocurren en los primeros 2-5 años, son más difíciles de tratar y tienden a impactar rápidamente la sobrevida. B) Masa tumoral asociada a tratamiento (Quimioterapia y trasplante de células troncales).

9. LINFOMAS INDOLENTES B

Los linfomas indolentes en su mayoría son representados por el linfoma folicular, la leucemia linfocítica crónica, los linfomas de zona marginal (MALT), como también por otros linfomas menos frecuentes como son el linfoma linfoplasmocítico (Enfermedad de Wäldenstrom) y la leucemia de células velludas entre otros.

9.1. Linfoma Folicular

El linfoma folicular es uno de los subtipos más frecuentes, representando el 20-30% de todos los linfomas y cerca del 70% de las variantes indolentes. La mediana de edad es de 65 años y no tiene predilección por sexo. Como describimos anteriormente es la contraparte maligna de los linfocitos de la zona clara del centro germinal. Se caracteriza por la traslocación t(14;18) que interpone el gen de BCL-2 posterior al promotor de la Ig pesada, haciendo constitutiva la expresión de esta proteína antiapoptótica. Probablemente debido al lento crecimiento tumoral, la mayoría de los casos debuta con enfermedad avanzada (estadíos III y IV), pero solo un 20% presenta síntomas B. Su reconocimiento radica en la expresión de marcadores de linaje B, junto con la expresión de los antígenos de superficie CD10, BCL-2 y BCL-6, y con expresión de Ki67 que oscila entre 10 y 30%. Desde el punto de vista histológico la OMS lo subclasifica en distintos grados: i) grado 1 y 2 con 15 centroblastos o menos por campo, ii) grado 3A con más de 15 centroblastos por campo y 3B, donde solo se reconocen centroblastos. En este último, la t(14;18) solo está presente en el 15-30% de los pacientes y se comporta de forma similar al LDCGB, por lo que tiende a ser excluido de los linfomas indolentes y se maneja desde el punto de vista terapéutico como un linfoma agresivo.

El tratamiento depende principalmente de la etapa y de la carga tumoral. Las presentaciones en etapas localizadas (etapa I y II contiguas) solo representan el 15-20% de los casos y el tratamiento es diferente al de etapas avanzadas, por lo que resulta importante una correcta etapificación con PET CT y eventualmente con biopsia de médula ósea. La radioterapia de 24 Gy en fracciones de 2 Gy se ha consolidado como la primera línea en estos casos, logrando respuestas en más del 90% de ellos con sobrevidas libres de progresión de 45-60% a 10 años y medianas de sobrevidas de 15-20 años. En este mismo sentido, estudios observacionales sugieren que un 50% de los pacientes en este estadio se curan por medio de la radioterapia. Estrategias con rituximab o quimioterapia sistémica resultan en similares o mayores tasas de sobrevida libre de progresión, pero no distinta supervivencia y expone a los pacientes a los riesgos del tratamiento sistémico. Los pacientes con etapas avanzadas (III y IV) y etapas II no limitadas a un campo de radiación de baja carga tumoral pueden beneficiarse de observación que en promedio se extiende por 2 a 3 años, pero con un porcentaje significativo de pacientes que pueden incluso no progresar por

más de 10 años. Es muy importante destacar que en distintos estudios fase 3 (comparados contra clorambucil, interferón y Rituximab) y otros estudios retrospectivos, la observación en este grupo de pacientes no ha repercutido en un mayor riesgo de transformación o en una menor sobrevida, lo que hace de la observación ("watch and Wait) una conducta no riesgosa y que debe ser discutida con cada paciente que cumpla con estas características. Para definir al grupo de pacientes candidatos a observación se han implementado algunos criterios de baja carga tumoral que han permitido una mayor estandarización en las poblaciones seleccionables para estudios clínicos y una herramienta para la orientación de los clínicos. Los criterios GELF propuestos el año 1997 por el Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte [GELA] son los más difundidos e incluyen: Ausencia de síntomas B, masa nodal < 7 cm, compromiso de menos de 3 sitios ganglionares con ganglios mayores a 3 cm, derrames pleurales/ascitis, citopenias por compromiso medular, esplenomegalia significativa y ausencia de riesgo de compresión de órganos por contigüidad. Por el contrario, los pacientes con linfoma folicular de alta carga tumoral deben recibir tratamiento sistémico. Las alternativas de tratamiento deben ser enfocadas en el paciente, con el fin de resolver síntomas, prolongar el tiempo en remisión o libre de terapia e idealmente con baja toxicidad. De acuerdo a lo anterior podemos contar con 2 grupos de pacientes: pacientes frágiles y pacientes no frágiles. Para los primeros, estrategias basadas en monoterapia con rituximab logran adecuadas tasas de remisión y de sobrevida libre de enfermedad. Para este grupo se han propuesto 2 estrategias: Rituximab por 4 dosis con posibilidad de retratamiento en la recaída o Rituximab por 4 dosis con terapia de mantenimiento (una dosis cada 2 o 3 meses por 2 años). La tasa de sobrevida libre de progresión es mayor con la estrategia de mantenimiento, pero a expensas de mayor utilización de rituximab sin cambios en sobrevida.

Para el segundo grupo de pacientes las alternativas combinan quimioterapia e inmunoterapia. Los esquemas más usados consideran en general 6 ciclos de rituximab u obinutuzumab (dirigidos contra la molécula CD20) combinado con CHOP (Ciclofosfamida, Doxorrubicina, Vincristina y Prednisona), CVP (similar a CHOP, pero sin Doxorrubicina para evitar toxicidad cardíaca) o Bendamustina. Las tasas de remisión completa y sobrevida libre de progresión son mayores con Bendamustina (respuesta global: 93%, respuesta completa 40% SLP a 5 años: 60%) y luego con CHOP (respuesta global 91%, respuesta completa: 30% SLP a 5 años 40%), sin embargo, hasta el momento ninguna ha logrado un beneficio en sobrevida global.

Situación similar es la que ocurre al comparar obinutuzumab (AcMo anti CD20 de 2da generación con Rituximab (1er AcMo aprobado en LNH Folicular el año 1998), que logra un incremento de 7% de sobrevida libre de progresión, sin cambios en sobrevida global y con un ligero aumento en el riesgo de infección. La combinación de lenalidomida (de uso oral) con rituximab (evaluada

en el ensayo clínico "Augment") demostró resultados comparables a los abordajes tradicionales en primera línea, pero cuenta con un menor seguimiento en comparación a las otras terapias. Posterior a la inducción, los pacientes con respuesta parcial o mejor pueden ser considerados para recibir estrategias de mantenimiento. El estudio PRIMA comparó el mantenimiento con rituximab cada 2 meses por 2 años versus observación. Luego de un seguimiento de 10 años la mediana de tiempo hasta la progresión fue de 10,5 años en la rama de mantenimiento y 4,1 en la rama de observación. Aunque estos resultados son alentadores, no han sido adoptados globalmente por la ausencia de beneficio en sobrevida global. Los tratamientos de las recaídas consideran las terapias no utilizadas en primera línea, pero logran respuestas menos duraderas. Actualmente en recaída están aprobadas también la terapia con lenalidomida y rituximab e inhibidores de PIK3K.

Existen diversas escalas pronósticas, siendo las más conocidas la escala de FLIPI y FLIPI2 (esta última en la era de rituximab). Estas escalas han mostrado buena correlación pronóstica; sin embargo, no logran traducirse hoy en cambios de conducta terapéutica. En los últimos años se ha constatado en diversos estudios que aproximadamente un 20% de los pacientes progresan dentro de los primeros 24 meses de la terapia (conocido como "POD24") y que esto se correlaciona con un pronóstico más desfavorable. La sobrevida global (SG) a 5 años de los pacientes POD24 es de 40-50% versus un 81-90% en los pacientes que no progresan en este intervalo. Por otro lado, los pacientes que se mantienen en remisión completa en este tiempo logran SG a 10 años de 90%, con curvas de sobrevida similares a las de la población general ajustada por edad. Desgraciadamente ninguna escala pronóstica logra identificar de forma certera a este grupo de pacientes.

En los pacientes POD24 es importante descartar una transformación a variantes más agresivas, que se describen en torno a 20-77%, dado que estos se benefician de terapias con antraciclinas de no haber sido usadas previamente. Por otro lado, la combinación bendamustina + obinutuzumab en foliculares no transformados con progresión precoz muestra resultados favorables (estudio GADOLIN) Evidencia retrospectiva sugiere además que este grupo de pacientes puede beneficiarse de consolidación con trasplante autólogo (especialmente en pacientes jóvenes).

9.2. Linfoma de zona marginal

Los linfomas de zona marginal representan el 10% de los LNH. La OMS separa a los linfomas marginales en 3 categorías que se nombran a continuación de mayor a menor frecuencia: Linfoma extranodal tipo MALT (asociado a tejido linfoide mucoso), Linfoma Marginal Esplénico y Linfoma Marginal Nodal. Estas 3 categorías comparten la célula de origen de la zona marginal, la expresión IHQ

de línea B con negatividad para CD10 y CD5, la fuerte asociación con estimulación antigénica crónica por bacterias o patologías autoinmunes (Sjogren) y la activación de la vía de NF-kB.

El Linfoma tipo MALT representa el 70% de los linfomas marginales y se desarrolla principalmente en mucosas (gástrica, intestinal, salival, conjuntival, ocular y tiroidea) de pacientes en torno a los 60 años. A diferencia de otros linfomas indolentes, la mayoría se diagnostica en estadios tempranos (I, II) por generar síntomas locales. Los tratamientos habitualmente dependen del sitio involucrado y puede requerir antibióticos, radioterapia local y en algunos casos quimioterapia y/o inmunoterapia. El Linfoma MALT gástrico es el más frecuente de estos y representa alrededor del 50% de los linfomas gástricos en globo. La infección por Helicobacter pylori (HP) está estrechamente involucrada en su patogénesis y explica el 90% de los casos. Se puede manifestar con síntomas gastrointestinales inespecíficos como dispepsia, reflujo, epigastralgia o baja de peso. La endoscopia digestiva alta tiende a ser el examen de entrada en el estudio y es fundamental la biopsia y búsqueda de HP por los medios que se disponga. Los pacientes con etapas localizadas, tras la etapificación con TAC o PET, son candidatos a tratamiento de erradicación de HP como única medida, con una tasa de respuesta que oscila entre 70-80% y que puede requerir de 12-18 meses para lograrse. El mayor predictor de fracaso al tratamiento de erradicación es la presencia de la traslocación t(11;18) que está presente en un 20-30% de los pacientes. Los raros casos de linfomas MALT gástricos HP negativos son tratados habitualmente con radioterapia o rituximab. Si bien en otros tipos de linfomas MALT se describe asociación con diversas bacterias, las respuestas a antibióticos son bajas y los pacientes tienden a tratarse con radioterapia o rituximab. Las sobrevidas de estos pacientes supera en muchas series el 90% a 10 años.

El Linfoma Marginal esplénico es una enfermedad infrecuente, la mediana de edad de presentación es similar al linfoma MALT y tiende a debutar con síntomas secundarios a esplenomegalia severa y/o compromiso medular. Si bien la gran mayoría debuta con enfermedad en etapa avanzada, el compromiso adenopático periférico es inhabitual, salvo por adenopatías hiliares esplénicas. El compromiso de médula ósea es casi de regla (85-94%) y por lo tanto, la biopsia de médula ósea es un buen abordaje diagnóstico. Además en algunos casos la CMF en sangre periférica puede sugerir el diagnóstico. Se describe compromiso hepático en ¼ de los casos y síntomas B en un 25-60% de los pacientes. Es importante notar que existe asociación con anemia hemolítica autoinmune y trombocitopenia inmune, por lo que en caso de presentar anemia o trombocitopenia no debe adjudicarse automáticamente a compromiso medular. En hasta ⅔ de los pacientes se evidencian células vellosas en el frotis que son similares a las que se presentan en leucemia de células velludas. Se diferencia de esta última por la IHQ y por el compromiso de la pulpa blanca y roja del bazo. La presencia de un pequeño componente monoclonal IgM está presente en entre

un 25 a 40% de los pacientes. Dentro del estudio no invasivo debe descartarse la presencia de infección activa por virus hepatitis C (VHC), aunque la asociación entre estas enfermedades tiende a concentrarse en reportes de pacientes de España e Italia. Como todo linfoma indolente en etapa avanzada existe la posibilidad de ventanas de observación sin tratamiento con buenos resultados, pero debido a que la mayoría de los pacientes debuta con síntomas, en la práctica, casi todos requieren tratamiento. En los pacientes con infección activa por VHC se recomienda como primera línea el tratamiento antiviral. En los pacientes sin infección por VHC la terapia de elección es rituximab. El rituximab en monoterapia, asociada o no con mantenimiento de rituximab por 1 año, logra respuestas globales por sobre el 90% de los pacientes reportados en estudios retrospectivos, con muy baja toxicidad. La esplenectomía puede ser otra alternativa en pacientes sin enfermedad nodal diseminada o compromiso extenso de médula ósea. El pronóstico de estos pacientes por lo general es favorable, con medianas que pueden superar los 10 años.

El linfoma marginal nodal es infrecuente y esto se entiende potencialmente por el escaso componente marginal en los ganglios periféricos no contiguos a mucosas (exceptuando los mesentéricos). Su presentación es similar al linfoma folicular y el tratamiento se extrapola también de lo estipulado para este. El diagnóstico requiere el descarte de compromiso extranodal y esplénico dado que hasta un 30-40% de los casos puede ser en realidad un compromiso avanzado de estos.

9.3. Linfoma linfoplasmocítico y Enfermedad de Wäldenstrom (EW).

El linfoma linfoplasmocítico es de escasa frecuencia. Prácticamente todos los casos se asocian con la producción de IgM y por lo tanto, se usa indistintamente el término de Enfermedad de Wäldenstrom (EW). Menos del 5% de los casos expresan IgA, IgG o ninguna Ig. Se cree que la contraparte benigna de la EW es un linfocito B de memoria que ha pasado por hipermutación somática (post centro germinal), pero que no logra realizar el cambio de clase. La mutación de MYD88, si bien no es específica de esta enfermedad, está presente en más del 90% de los casos y está ligado fuertemente a la sobrevida y crecimiento de sus células tumorales. Los síntomas de la EW son causados tanto por la infiltración tisular como por los efectos biofísicos y autoinmune de la paraproteína IgM. Habitualmente los síntomas generales que predominan son la fatiga, el compromiso del estado general y a veces el sangrado de encía y/o mucosas. La infiltración más común es la de médula ósea, explicando una de las causas de anemia de estos pacientes. A diferencia de otros linfomas indolentes la presencia de esplenomegalia y linfadenopatías es rara (<15%) y su aparición, en conjunto con una baja cantidad de IgM debe hacer pensar en un linfoma marginal esplénico. La paraproteína IgM se asocia a varios cuadros clínicos, siendo los más destacables el síndrome de hiperviscosidad, la anemia hemolítica por crioaglutininas

y la neuropatía. La correlación entre valores de IgM y viscosimetría no es lineal, pero pequeños cambios en la IgM pueden generar grandes variaciones en la viscosimetría cuando su concentración es mayor a 4 g/dl. Los síntomas de hiperviscosidad suelen verse desde viscosimetrías de 4 cp y se caracterizan por visión borrosa, epistaxis, mareo, sordera, tinnitus y cefalea entre otros. Cambios neurológicos mayores también pueden ocurrir. Como ejemplo, en una compilación de dos series la presencia de síntomas de hiperviscosidad con niveles de viscosimetría menor de 3, mayor de 4 y mayor de 5 cp fue de 0%, 67% y 75%, respectivamente.

El diagnóstico de la EW se establece con la presencia de un infiltrado Linfoplasmocitario B mayor o igual al 10% asociado a la presencia de un componente monoclonal IgM. Al igual que el mieloma múltiple existen estadios previos como el MGUS IgM y Smoldering IgM que no se benefician de inicio de tratamiento, pero hay que considerar que valores de IgM mayores a 6 g/dl se han asociado a un corto tiempo hasta el inicio de síntomas. Al igual que otros linfomas indolentes el tratamiento se debe iniciar cuando existen síntomas de la enfermedad y/o citopenias significativas. El tratamiento puede variar según la sintomatología, pero en casi todos los casos incluye rituximab. El rituximab debe usarse cautelosamente en casos de elevaciones marcadas de IgM dado el riesgo de exacerbaciones (“flare”) posteriores a este. Por lo tanto, se recomienda evitar el uso inicial de rituximab en casos de IgM mayores a 4 g/dl. Según la urgencia de los síntomas entonces, los pacientes pueden ser candidatos a plasmaféresis o el inicio de terapia con el resto de las drogas de un determinado esquema. Los esquemas más frecuentemente usados son Bendamustina, con rituximab y en algunos casos también R-CVP o FCR (Fludarabina, Ciclofosfamida y Rituximab). La sensibilidad de esta enfermedad a bortezomib e inhibidores de BTK (bruton tirosina kinasa) ha revolucionado el tratamiento de esta enfermedad, pero por ahora solo con aprobación en recaídas. El pronóstico de sobrevida en globo tiende a superar los 10 años, pero al igual que otros linfomas indolentes, existen grupos de alto riesgo con menores sobrevidas.

9.4. Leucemia de células velludas (LCV)

La LCV es un linfoma indolente de baja frecuencia. Dado la detección de hipermutación somática se cree que la célula de origen sería un linfocito B post centro germinal de memoria. La mutación de BRAF V600E es central en su patogenia y explica tanto la morfología vellosa como también su potencial proliferativo y mayormente antiapoptótico. Se presenta habitualmente entre los 50 y 60 años y tiene una predileccion por el sexo masculino (relación 4:1). La presentación característica es con citopenias marcadas, monocitopenia, células velludas al frotis y esplenomegalia, que puede ocasionalmente ser masiva. La presencia de adenopatías, por otro lado, es infrecuente. Debido a la presencia de fibrosis colágena y de reticulina, el estudio medular suele ser “seco” (no se

logra obtener muestra para el análisis citológico o por CMF) y el diagnóstico se basa en el análisis por CMF en sangre periférica o en el análisis IHQ de la biopsia. Además de la marcación IHQ de línea B, posee una marcación IHQ distintiva: CD103+, CD25+, CD11c+. La marcación de Anexina A1 es específica, pero no sensible. Casi todos los pacientes requieren tratamiento al momento del diagnóstico y en este caso, un solo ciclo de cladribine o pentostatina (poco utilizada actualmente por su mayor toxicidad) logra respuestas globales sobre el 95% de los casos. La adición de Rituximab o terapias dirigidas contra BRAF (Vemurafenib) han mostrado alta eficacia, pero por el momento, reservadas para recaídas. El pronóstico es bueno con medianas de tiempo hasta la recaída de más de una década y sobrevidas globales cercana a 30 años.

10. LINFOMAS AGRESIVOS B

Existen múltiples tipos de linfomas agresivos B, que pueden surgir desde distintas etapas del desarrollo del linfocito B. Nos centraremos a continuación en los tipos más frecuentes.

10.1. Linfoma difuso

El LDCGB es el linfoma agresivo más común en la población y representa el 30% de los LNH. La mayoría de los casos ocurre “de novo”, pero ocasionalmente puede ser la transformación de una variante indolente. La OMS en su versión de los años 2008 y 2016 subclasifican al LDCGB en distintos subtipos con diferentes características clinicopatológicos; sin embargo, solo en algunos de ellos existen implicaciones en el tratamiento. A pesar de estas subcategorías, la mayoría queda bajo el diagnóstico de LDCGB no especificado (NOS), que es en el cual nos centraremos en este apartado. Las características de expresión génica han distinguido dos perfiles genéticos que se cree se originan de distintas células de origen: célula B de centro germinal (GCB) y célula B activada (ABC); un 10-15% resulta inclasificable. Un acercamiento más práctico a estos tipos es el que se realiza por medio de la inmunohistoquímica. El algoritmo de Hans es el más utilizado y propone el uso de CD10, BCL6 y MUM1 para separar ambas entidades; su concordancia con perfiles de expresión génica, sin embargo, es del 80%. La inmunohistoquímica además es útil para identificar sobreexpresión de proteínas importantes desde el punto de vista pronóstico y potencialmente terapéutico. La sobreexpresión de MYC (>40%) y de BCL-2 (>50%) está presente en el 30% de los LDCGB y se le denomina LDCGB doble expresor. Esta sobreexpresión no refleja necesariamente rearreglos genéticos de estas proteínas, dado que existen varias vías moleculares para su expresión. Los rearreglos de MYC junto a BCL2 y/o BCL6, denominados tradicionalmente linfomas doble o triple hit (DH/TH), están presente en el 4-8% de los LDCGB. El 90% de los casos (DH/TH) tiene el perfil de GCB. Hoy, por sus implicaciones diagnósticas, pronósticas y potencialmente terapéuticas, los linfomas DT/TH han sido agrupados en otra

categoría, distinta al LDCGB, denominada Linfomas B de alto grado (que incluye también a los linfomas previamente denominados "burkitt like" por morfología)

Con respecto a la clínica la mediana de edad de presentación está en torno a los 60 años y un 30% se presenta sobre los 75 años. El crecimiento ganglionar progresivo es el síntoma más frecuente, un 60% se presenta en etapas avanzadas y hasta un 40% tiene compromiso extranodal. Un 30% presenta síntomas B al momento del diagnóstico y en más del 50% se encuentra la LDH elevada. La etapificación con PET CT y ocasionalmente con médula ósea, resulta fundamental en la actualidad dado que presentaciones localizadas pueden ser susceptibles de tratamientos acortados.

El esquema RCHOP cada 21 días es el estándar de tratamiento y las antraciclinas y el rituximab, a diferencia de linfomas indolentes, resultan vitales para lograr la curación. Es más, estudios demuestran que una reducción mayor al 20-25% de las dosis de antraciclinas en pacientes jóvenes (<80 años) confiere menor probabilidad de respuesta. El rituximab por su parte demostró un aumento de 15% en la sobrevida global sin aumentar la toxicidad. Desde la década de los 90 hasta la fecha se han intentado probar esquemas de mayor intensidad, llamados en su momento terapias de 2da y 3ra generación (MACOP-B, ProMACE-CytaBOM en 1993, Obinutuzumab-CHOP en 2017 y DA-EPOCH R en 2020) sin mejorar resultados. Con la misma intención de mejorar respuestas, se han intentado añadir nuevas drogas al esquema RCHOP (Lenalidomida, Bortezomib, Ibrutinib); sin embargo, el resultado no ha sido distinto. Es posible que una mejor clasificación según características biológicas pueda cambiar estos resultados en el futuro. Uno de los grandes cambios del tratamiento ha sido la posibilidad de tratamiento acortado en pacientes con enfermedad localizada y de bajo riesgo. El estudio FLYER y posteriormente el LYSA/GOELAMS 02-03 en grupos seleccionados de pacientes con enfermedad localizada y con un PET después de 2 o 3 ciclos (PET interino o PETi) sin actividad, demostraron igualdad de resultados y menor toxicidad al ser tratados con 4 ciclos en comparación a los 6 ciclos tradicionales.

En enfermedad avanzada por su parte, el tratamiento consta de 6 ciclos de RCHOP y agregar más no mejora los resultados. La terapia de mantenimiento con rituximab en LDCGB no ha demostrado beneficio y por lo tanto no debe considerarse dentro de las opciones terapéuticas. En globo, un 60% de los pacientes logra respuesta sostenida y curación con este abordaje, un 10-15% es refractario a RCHOP y un 20-25% recae después de una buena respuesta, predominantemente dentro de los primeros 2 años. El pronóstico de los pacientes refractarios y recaídos es desfavorable, con medianas de sobrevida que no superan los 6 meses en caso de refractariedad a la primera línea. Existen diversos esquemas de segunda línea (R-ICE, R-GDP, R-ESHAP, R-DHAP), pero ninguno a la fecha ha destacado por sus resultados y las diferencias están dadas princi-

palmente por el perfil de toxicidad. Los pacientes con buen estado general (en general menor a 70-75 años), con respuesta al menos parcial al esquema de segunda línea, se benefician de consolidación con trasplante autólogo de precursores hematopoyéticos. La sobrevida libre de progresión de los que llegan a trasplante, sin embargo, no supera el 50%. La terapia celular de linfocitos T modificados (CAR-T) ha crecido enormemente en los últimos años y los resultados publicados a la fecha ya resultan alentadores.

El pronóstico del LDCGB depende de varios factores que clásicamente han sido agrupados en la escala de IPI. Además los pacientes con subtipo ABC y los pacientes DE/TE logran un 10-15% menos SLP que el subtipo GCB y los pacientes sin DE/TE. Los pacientes con linfomas avanzados DH/TH por su parte tienen el peor pronóstico de todos, con SLP de alrededor de 30-35% a 5 años. Es debatido actualmente si esquemas de mayor intensidad mejoran los resultados en este grupo.

10.2. Linfoma de Burkitt (LB)

El linfoma de burkitt es uno de los tumores más agresivos, con alta tasa de replicación y rápido desarrollo de síntomas. El sello genético de esta enfermedad es la traslocación y desregulación de c-Myc en el cromosoma 8. En el 80% de los casos la traslocación es entre c-Myc y el gen de la cadena pesada de la Inmunoglobulina (IgH) ubicada en el cromosoma 14, en el 15% entre c-Myc y el gen de la cadena liviana Kappa en el cromosoma 2 y en el 5% restante entre c-Myc y el gen de la cadena liviana Lambda en el cromosoma 22. En la histología el patrón de “cielo estrellado” es característico y está conformado por células tumorales basófilas de mediano tamaño (“el cielo") e histiocitos que ingieren los abundantes restos apoptóticos tumorales (“las estrellas”). La célula de origen es el centroblasto del centro germinal y por lo tanto, además de los marcadores B, expresa CD10 y BCL-6. La expresión de BCL-2 es infrecuente y la ausencia de expresión de TdT (una enzima expresada en la etapa de reordenamiento de VDJ) lo diferencia, entre otros marcadores, de leucemias linfoblásticas agudas. La expresión de Ki67 es característicamente cercana al 100%. Se describen 3 formas de presentación, distintas en epidemiología, en clínica y en su relación con el EBV. La presentación endémica fue la primera descrita y afecta principalmente a niños y jóvenes del continente africano. Se caracteriza por afectación predominantemente del hueso de la mandíbula u otros huesos faciales. La infección con EBV y la expresión de su genoma está presente virtualmente en todos los casos. La variante esporádica es la más común en occidente, pero no representa más del 1 a 2 % de los linfomas no Hodgkin. Se presenta en población joven, preferentemente masculina. Habitualmente debuta con una masa “bulky” abdominal que frecuentemente compromete el intestino. La presencia de adenopatías por lo general es localizada y el compromiso de médula ósea ocurre en el 30% de los casos. La relación con el EBV es minoritaria (10-20%).

La tercera variante es la relacionada a inmunosupresión y se presenta preferentemente en pacientes con la infección del VIH con recuentos de CD4 más bien altos (>200 cel/ul) y en ausencia de infecciones oportunistas. El EBV está presente en el 30-40% de estos casos. A diferencia de otros linfomas asociados al VIH la incidencia del LB no ha cambiado en la era de la terapia antirretroviral. Una característica especial del linfoma de Burkitt es que un 15-30% de los pacientes tienen compromiso del sistema nervioso central (SNC) al momento del diagnóstico. Este compromiso tiende a ser leptomeníngeo, por lo que la punción lumbar es de regla en estos pacientes.

Múltiples estudios han mostrado que el tratamiento con RCHOP es insuficiente en estos pacientes y que mejores resultados se logran con esquemas de mayor intensidad asociados a quimioterapia intratecal. Los 3 esquemas más ampliamente usados en la actualidad son el R-CODOX-M-IVAC (régimen Magrath), El R-HyperCVAD y más recientemente el R-DA-EPOCH. Las respuestas al tratamiento oscilan entre el 70-90% y las sobrevidas libres de progresión oscilan entre 60 y 90% según el riesgo. La edad sobre los 40 años, elevaciones marcadas de LDH, compromiso del SNC y el compromiso medular están fuertemente asociados al pronóstico. Estudios retrospectivos y análisis de subgrupos de estudios fase II permiten especular que enfermedades de alto riesgo, con compromiso del SNC y/o con compromiso de médula ósea podrían beneficiarse de R-CODOX-M-IVAC e R-HyperCVAD por sobre R-DA-EPOCH. Actualmente está en desarrollo un estudio randomizado fase III que pretende dilucidar esta incógnita. Las recaídas de esta enfermedad, si es que ocurren, tienden a hacerlo en los primeros 6 a 12 meses, por lo que pacientes que permanecen en remisión posterior al año tienen una altísima probabilidad de estar curados.

10.3. Linfoma del manto

El linfoma de Células del Manto representa alrededor del 7% de los linfoma no Hodgkin. La t(11;14) con la consiguiente sobreexpresión de ciclina D1 define a esta entidad, pero no explica su desarrollo completamente. Esta traslocación interpone el gen ciclina D1, regulador de la fase G1 del ciclo celular, posterior al promotor de la cadena pesada de Ig, haciendo su expresión constitutiva. En la actualidad se reconocen 2 subtipos de linfoma del manto provenientes cada uno de distintas células de origen. Por un lado una variante nodal (80-90%), de curso agresivo, con origen en un linfocito B pre centro germinal (IGHV no mutado) y expresión aberrante de SOX11 y por otro lado una forma leucémica no nodal (10-20%), más indolente, SOX11 negativo, de origen en un linfocito post centro germinal (IGHV mutado). La mediana de presentación es de 65 años y afecta mayoritariamente a hombres en una relación 3:1. Típicamente los pacientes se manifiestan en etapas avanzadas con poliadenopatías en el 75% de los casos y compromiso esplénico un 40-60%. El compromiso extranodal es frecuente, siendo los principales sitios afectados el anillo de la waldeyer, médula

ósea (> 60%), sangre periférica (13-77%) y de forma especial el tracto gastrointestinal, que llega a ser sintomático en el 25% de los casos. En la histología, si bien se describen 4 morfologías, del punto de vista pronóstico solo vale la pena identificar los subtipos blastoides y pleomórficas que se asocian a cursos más agresivos. La IHQ muestra células CD20+, CD19+ y de forma especial ciclina D1+, CD5+, CD200-, CD23-. SOX11 está expresado en el 90% de los linfomas del manto (variante nodal) y podría ser útil en raros casos sin expresión de ciclina D1 y también como marcador pronóstico. El Ki67 debe intentar consignarse en todos los casos por su importancia pronóstica debido a que una expresión >30% identifica a pacientes de mayor riesgo. Desde el punto de vista citogenético es importante realizar la búsqueda por FISH de la t(11;14) que está presente en prácticamente todos los pacientes. El tratamiento médico ha cambiado sustancialmente en la última década. El beneficio de la citarabina, bortezomib, trasplante autólogo, mantenimiento con Rituximab e inhibidores de bruton tirosina kinasa son ejemplos de esto. En pacientes jóvenes el esquema nórdico (R-MaxiCHOP + Citarabina en altas dosis) y el esquema R-DHAP han relegado al tradicional RCHOP, al mostrar mejores tasas de respuestas y mejores tasas de SLP en estudios randomizados. El trasplante autólogo en primera remisión, a diferencia de lo que ocurre en otros linfomas, es una estrategia que ha demostrado beneficio tanto en SLP como en SG. El mantenimiento con rituximab por 3 años posterior al trasplante es considerado un estándar de tratamiento luego de que un estudio randomizado fase 3 demostrara casi un 10% de beneficio en SG a 4 años. La terapia en pacientes mayores no candidatos a trasplante considera la adición de bortezomib en primera línea (VR-CAP) o el esquema con bendamustina rituximab. El mantenimiento con rituximab en este grupo de pacientes es una estrategia que beneficia principalmente a los pacientes tratados con RCHOP. El curso clínico de esta enfermedad es altamente heterogéneo, si bien las respuestas iniciales tienden a ser buenas, las recaídas precoces son frecuentes y la mayoría sigue un curso agresivo. Sin embargo, 10-15% de los pacientes puede tener un curso indolente que puede ser incluso candidato a observación. La mayoría de los casos corresponde a la variante leucemia no nodal SOX11 negativo, pero se está intentando identificar a los pacientes de la variante nodal que puedan tener el mismo curso.

En recaídas las terapias con iBTK, Venetoclax (inhibidor de BCL-2), trasplante alogénico y CAR-T tienen una especial relevancia. El pronóstico de esta enfermedad es variable y oscila entre el año y los 12 años según el riesgo, pero sin lograr "plateau" en las curvas de sobrevida. Algunas de las variables pronósticas se encuentran agrupadas en la escala de MIPI, pero otras variables aisladas como mutaciones de P53, el Ki67 >30% y la morfología blastoide logran identificar rápidamente a pacientes de alto riesgo.

11. LINFOMAS T y NK

Los linfomas T periféricos representan el 15-20% de los linfomas no Hodgkin y están compuesto por grupos heterogéneos de linfomas procedentes de linfocitos T post tímicos y células natural killer (NK). A diferencia de lo que ocurre con los LNH B existe menor claridad en la patogenia y en la célula de origen, y probablemente refleja la variedad y plasticidad del linfocito T. El diagnóstico anatomopatológico no siempre es fácil y se obtiene de la suma de varios factores: desbalances marcados entre poblaciones CD4 y CD8, pérdidas aberrantes de marcadores T (CD7, CD2, CD3, CD5) y análisis de clonalidad TCR (Receptor de Células T).

Existen 2 grandes grupos de LNH T: los linfomas cutáneos, de comportamiento frecuentemente indolente y los linfomas periféricos (nodales) de comportamiento agresivo. Describiremos algunos de los más frecuentes a continuación.

11.1. Linfomas T periféricos

El LNH T NOS (no especificado) es la entidad más frecuente, representando el 30% de ellos. Si bien es considerado el símil del LDCGB, en realidad es la terminología de LNH T que no cumple criterios de otros subtipos (de exclusión). No tiene un patrón histológico determinado y su IHQ es habitualmente CD4 más que CD8, con pérdida frecuente de CD5 y CD7 y con un 30% que expresa CD30. El TCR es αβ. Habitualmente la presentación es nodal y avanzada, pero puede comprometer territorios extranodales con frecuencia. El esquema CHOP se ha usado tradicionalmente por conveniencia, aunque los resultados son inferiores a los obtenidos en LNH B, con sobrevidas a 5 años de un 20-30%. El etopósido (inhibidor de Topoisomerasa), sin un sustento firme, suele añadirse al esquema CHOP en algunos centros, basado en estudios retrospectivos que muestran tendencias no significativas a mejores desenlaces. El impacto del brentuximab (AcMo anti CD30) tampoco es claro en los pacientes que expresan CD30 dado la subrepresentación de este grupo en el estudio randomizado fase 3 Echelon 2.

El LNH angioinmunoblástico es una entidad específica y especial dentro de los LNH T. Su origen, procedente de linfocitos T helper foliculares (Thf) del centro germinal explica en parte su asociación con fenómenos de autoinmunidad por disregulación de linfocitos B. Algunos hallazgos claves del punto de vista histológico son la proliferación marcada de las vénulas poscapilares de endotelio alto y de las células dendríticas foliculares (CD21+). Su patrón IHQ característico considera CD4+, CD3+ CD2+ y otros marcadores de célula Thf como CD10+ y BCL6. La expresión de EBV es frecuente. Desde el punto de vista genético las mutaciones de TET2, IDH2 y DNMT3A son habituales. El tratamiento de primera línea aún es el CHOP/CHOEP (CHOP más Etopósido) y los resultados son similares a los obtenidos en el LNH T NOS. La evidencia retrospectiva actual ha mostrado el beneficio del trasplante autólogo de consolidación en la primera remisión.

En recaídas y debido a sus altas mutaciones de TET2, la terapia con azacitidina (droga hipometilante) fue estudiada y ha mostrado resultados favorables.

El LNH T anaplásico sistémico de células grandes (ALCL por sus siglas en inglés) está compuesto de células de gran tamaño con núcleo redondo-oval, irregular, indentado y nucléolo prominente con expresión CD4+, CD3+ y CD30+ intenso. La expresión de ALK producto de la t(2;5) está presente en el 60-80% de los LNH T ALCL y diferencia, por lo tanto, 2 entidades; ALCL ALK+ y ALCL ALK-. Ambas son de presentación nodal y la primera tiende a concentrarse en población más joven, lo que explica en gran parte su mejor pronóstico (SG 5 años 60-79% vs 49%). Estudios retrospectivos han avalado la adición de etopósido al esquema CHOP, mostrando mejores resultados en población con LNHT ALCL ALK+ joven (<60 años) con LDH normal. Más recientemente el estudio ECHELON 2 demostró el beneficio de adicionar brentuximab en vez de vincristina en el esquema CHOP.

La Leucemia Linfoma T del adulto (ATLL por sus siglas en inglés) de mayor prevalencia en el caribe y en el sur de Japón, está causada directamente por la infección por HTLV-1 que se contagia principalmente por transmisión vertical por lactancia o sangre. La incidencia de HTLV-1 es muy variable en diferentes regiones del mundo, con prevalencias muy bajas en Europa, pero de hasta 20% en algunas regiones de Asia. A pesar de su asociación, la mayoría de los portadores de este virus no desarrollará ATLL (incidencia acumulada de 2,5%). Salvo por sus variedades crónicas e indolentes (de baja frecuencia), la ATLL es una enfermedad de altísima agresividad. Se manifiesta con enfermedad leucémica o linfomatosa y se asocia a lesiones cutáneas e hipercalcemia. Característicamente en el frotis se pueden encontrar células en flor y su expresión IHQ es CD4+, CD25+, CD7-. Demostrar la infección de HTLV-1 es esencial para el diagnóstico. Los tratamientos basados en DA EPOCH, HyperCVAD y VCAP/AMP/ VECP (en japon), logran respuestas en torno al 40-50%, pero son de corta duración. La variante puramente leucémica puede lograr mejores resultados con la combinación de interferón y zidovudina. Considerando las respuestas cortas y transitorias estudios retrospectivos y de guías japonesas recomiendan el trasplante alogénico en primera remisión.

El linfoma NK, de mayor prevalencia asiática, está fuertemente asociado a infección por EBV y cuenta con una presentación localizada típica; el linfoma NK extranodal nasal (NKENN). En la histología es característica la angioinvasión y la necrosis. Del punto de vista IHQ, las células presentan expresión de CD3 citoplasmático, CD56+ y CISH+ para EBV. Por su alta expresión de glicoproteína P habitualmente se le considera resistente a antraciclinas. Los tratamientos, entonces, están basados en gemcitabina, platinos y asparaginasa. La variante NKENN logra sus mejores resultados al combinar quimioterapia con radioterapia simultánea. El pronóstico depende de la edad, compromiso extranasal, disemi-

nación de la enfermedad y carga viral de EBV. Las sobrevidas a 3 años según los distintos riesgos oscila entre un 28 a un 81%

11.2. Linfomas T cutáneos

En cuanto a los linfomas cutáneos, la micosis fungoide (MF) y el síndrome de Sézary (SS) son las entidades más frecuentes. La primera representa el 50% de los linfomas cutáneos y se caracteriza por epidermotropismo de linfocitos T CD4+ con pérdida aberrante de CD7 y/o CD26. Se manifiestan por medio de lesiones a veces pruriginosas en forma de placas, parches, nódulos o tumores de distribución, por lo general, en zonas del tronco y zonas no expuestas al sol (en "traje de agua"). Su curso es indolente y por lo tanto, el manejo de la gran mayoría de los pacientes solo se basa en terapias locales con corticoides tópicos, radioterapia localizada o PUVA. En la medida que se extiende la enfermedad tratamientos con bexaroteno, metotrexato en dosis bajas y quimioterapia en monodroga (gemcitabina, doxorrubicina liposomal, brentuximab), son de utilidad. El trasplante alogénico se reserva para pacientes con enfermedad avanzada. El pronóstico de sobrevida depende de la extensión, llegando a ser de 97% a 10 años en caso de pacientes con enfermedad localizada con compromiso menor al 10% de la superficie corporal (30% de los casos), pero de solo un 20% en pacientes con compromiso adenopático. El SS se caracteriza por eritrodermia, linfoadenopatías diseminadas y presencia de células de Sézary en la piel, sangre y ganglios. Su comportamiento es agresivo y el manejo es similar a la MF avanzada. La fotoféresis y el interferón son otras herramientas útiles en este caso. La sobrevida a 5 años es de solo un 20-30% y el trasplante alogénico ofrece la única opción curativa.

12. LINFOMA DE HODGKIN

El linfoma de hodgkin representa el 10% de todos los linfomas y es probablemente una de las entidades icónicas de la hematología. Fue descrita por el Dr. Thomas Hodgkin en 1932 y fue la primera enfermedad avanzada ("metastásica") en ser curada con radioterapia y/o poliquimioterapia. Si bien la presentación clínica se inserta dentro de los linfomas agresivos, sus peculiaridades genéticas, fisiopatológicas, diagnósticas y terapéuticas han hecho meritoria una mención aparte en todos los tratados.

El linfoma de hodgkin está compuesto de 2 tipos, linfoma de Hodgkin clásico (LHc) y el LH de predominio linfocítico nodular (LHPLN). El Linfoma de Hodgkin Clásico representa el 95% de los casos y se subdivide en 4 tipos histológicos: Esclerosis nodular (70%), celularidad mixta, rico en linfocitos y depleción linfocitaria. Los 4 subtipos se definen por células de Reed Steenberg (RS) rodeada de un gran infiltrado inflamatorio mixto y policlonal (salvo la variante depleción linfocitaria). La célula de RS se caracteriza por ser una célula grande de citoplasma más bien abundante, binucleada y con presencia de intensos nucleolos ("ojos de búho"). A

diferencia de lo que ocurre en los linfomas no hodgkin, en el LHc la célula patológica de RS solo representa el 0.1-10% del infiltrado. La célula de origen del LHc, aunque no es equiparable a ninguna etapa del desarrollo del linfocito, correspondería a un linfocito B del centro germinal que ha perdido la capacidad de expresión de inmunoglobulinas de superficie y de factores de transcripción normales. De la misma forma y de un punto de vista IHQ la célula de RS no suele expresar CD20, CD19, BCL-6 ni CD45. Su IHQ característica es CD30+ (100% de los casos), CD15+, PAX15+ débil y MUM1+. El infiltrado inflamatorio policlonal mayoritario es reclutado por la célula de RS a través de múltiples quimioquinas, pero no logra generar una reacción antitumoral debido a múltiples vías de evasión inmune. Las más características son la pérdida de moléculas del complejo de histocompatibilidad mayor y la sobreexpresión de PDL1 y PDL2 secundaria a amplificación, ganancia de genes o polisomía del cromosoma 9p24.1 (97% de los casos). En el LHPLN las células características son denominadas células en "palomita de maíz" por su núcleo vesicular multilobulado con nucleolos periféricos. El infiltrado no maligno es menos heterogéneo que en el LHc y está compuesto principalmente de pequeños linfocitos B y linfocitos T que usualmente se agrupan en torno a la célula maligna formando rosetas. El origen de esta célula corresponde también a un linfocito B, pero en transición hacia célula de memoria. A diferencia de la célula de RS, esta si expresa marcadores B CD19+, CD20+, CD45+ y BCL-6+ y no expresa CD30, CD15 ni PDL1/PDL2.

El LH tiene una distribución etaria bimodal con un acentuado pico entre los 15-35 años y otro de menor cuantía alrededor de los 60 años que presenta una mayor asociación con EBV. La presentación clínica del LHc habitual es por medio del crecimiento indoloro de adenopatías cervicales y supraclaviculares (60-80% de los casos). El compromiso mediastínico es frecuente y puede generar masas de gran tamaño que pueden incluso ser detectadas por radiografía de tórax. La diseminación al ser linfática tiende a seguir un patrón ordenado por contigüidad y rara vez iniciarse en la región infradiafragmatica (<10%). Los síntomas B en etapas avanzadas pueden llegar al 40%, pero en etapas localizadas no superan el 10-20%. Existen otras manifestaciones paraneoplásicas como el prurito no asociado a exantema y el dolor de adenopatías con el consumo del alcohol, sin embargo, su ocurrencia está lejos de ser frecuente. En el LHPLN el 70% se presenta en etapas localizadas con compromiso adenopático en el 100% de los pacientes y de preferencia en localizaciones periféricas de fácil detección y de temporalidad crónica. Los síntomas B y el compromiso extranodal es inhabitual.

La etapificación, como vimos en el inicio del capítulo, debe ser por medio de PET CT FDG, debido al mejor rendimiento y por permitir eliminar la necesidad de biopsia de médula ósea. A continuación, la estratificación por riesgo es diferente según se trate de enfermedad localizada o enfermedad avanzada. En etapa localizada las escalas más usadas son las de la EORTC y la de GHSG que entre otros factores, incluyen a la edad mayor 50 años, afectación de más de 2 grupos ganglionares, síntomas B y masa mediastínica de gran tamaño. Los pacientes con

uno o más de estos criterios se les ha denominado etapa localizada desfavorable. En muchos estudios randomizados se han incluido los pacientes etapas IIB, II Bulky o II desfavorable junto a los de etapa avanzada. En pacientes con etapa avanzada la escala de IPS es la más conocida e incluye albúmina, edad, compromiso etapa IV, linfocitos, glóbulos blancos y anemia. En análisis multivariados la edad ha sido uno de los factores más influyentes del pronóstico. Una vez iniciado el tratamiento, la respuesta lograda en el PET interino (PETi) después de 2 ciclos es uno de los principales marcadores pronósticos, con resultados consistentes en diversos estudios y posibilitando cambios de conducta terapéutica.

La historia del tratamiento de LHc es larga y enriquecedora, combinando tratamientos de radio y quimioterapia que han logrado altas tasas de curación, incluso en etapas avanzadas. Debido al alto éxito de los tratamientos en una población mayoritariamente joven, los esfuerzos se han volcado a intentar disminuir la toxicidad a largo plazo (segundas neoplasias, cardiotoxicidad e infertilidad). Con este fin y por medio de múltiples estudios randomizados se ha definido que la terapia guiada por PETi logra limitar el número de ciclos y acotar los escenarios de beneficio de la radioterapia. Los esquemas más utilizados actualmente en primera línea son ABVD y BEACOPP escalado; este último ha mostrado una mayor tasa de respuestas y de sobrevidas libres de progresión, pero a expensas de mayor toxicidad.

En enfermedad localizada favorable (sin Bulky) el estudio HD10 estableció el primer estándar de tratamiento al demostrar que 2 ABVD + radioterapia con 20 Gy logra mismos resultados que 4 ABVD + radioterapia (SLP 91 y 93% respectivamente p 0,38). En un intento posterior de evitar radioterapia los estudios RAPID UK, H10 y el HD16 randomizaron pacientes con PETi negativo a recibir o no radioterapia. Si bien los resultados globales fueron buenos y no hubo diferencia en sobrevida global, entre un 7-10% de los pacientes que no recibieron radioterapia presentaron recaída.

En enfermedad localizada desfavorable, los estudios también han avalado el uso de 4 ABVD con radioterapia con 30 Gy de consolidación, sin embargo, según el estudio H10, el impacto de la RT impresiona menor que en el riesgo favorable y en caso de evitarse se debería apuntar a 6 ciclos de ABVD. Posteriormente el ensayo HD14 evaluó el inicio de BEACOPP por 2 ciclos seguido de 2 ciclos de ABVD. Este esquema mejoró la SLP en aproximadamente 6%, pero sin cambios en sobrevida global y a costas de mayor toxicidad. Iniciar con BEACOPP 2 ciclos, por otro lado y luego desescalar a 2 ciclos de ABVD permitiría evitar la radioterapia sin perder control tumoral.

En suma, en etapa localizada dado los excelentes resultados solo con quimioterapia debe evaluarse paciente a paciente la indicación de radioterapia, privilegiando, por ejemplo, las terapias combinadas en pacientes con adenopatías cervicales y las terapias basadas solo en quimioterapia en mujeres con adenopatías mediastínicas con el fin de disminuir el riesgo futuro de cáncer de mama.

En enfermedad avanzada los médicos debaten entre ABVD y BEACOPP escalado. Ambos esquemas logran altas tasas de curación (70-85%), pero el BEACOPP escalado ofrece algunas ventajas que deben considerarse: logra mejor SLP que el ABVD (10% aprox) y un 75% de los pacientes podría terminar el tratamiento en 3 meses (4 ciclos) con bajo riesgo de recaída (ensayo HD18). Dado que la sobrevida global es similar entre ambos esquemas, la tolerancia al riesgo de la recaída debe conversarse con el paciente y sopesarse con él riesgo de efectos adversos durante la quimioterapia y posterior a esta. El tratamiento con ABVD tiene menor toxicidad a corto y largo plazo y pacientes con PETi negativo después de dos ciclos, pueden prescindir de la bleomicina sin impactar los resultados (estudio RATHL). A diferencia de lo que ocurre con etapas localizadas la radioterapia no agrega beneficio si el PETi y PET de fin de tratamiento resultan en respuesta metabólica completa. Otra droga que ya fue estudiada en primera línea, luego de buenos resultados en 2da y tercera línea fue brentuximab (anti CD30). El estudio Echelon 1 intercambió el brentuximab por la bleomicina, logrando ligeras mejores sobrevidas libres de progresión a costa de un aumento de la neuropatía, pero con un descenso de la toxicidad pulmonar.

En pacientes recaídos -especialmente recidivas precoces- el trasplante autólogo ofrece una posibilidad real de curación. Los esquemas tradicionales previo al trasplante (ICE, GDP, GVD) se han ido modificando por terapias asociadas a brentuximab o de forma más importante, a terapias asociadas a inhibidores del PD1, una importante revolución en el tratamiento del LH. Es importante señalar que dado su efectividad, estudios recientes ya están incorporando estas drogas en primera línea. En el escaso grupo de pacientes recaídos posterior al trasplante autólogo, el trasplante alogénico logra curar a un número importante de casos (40-60% en recaídas quimiosensibles), pero con importantes niveles de toxicidad. En pacientes no candidatos a trasplante o recaídos posterior a estos, la terapia indefinida con inhibidores de PD1 muestra resultados significativos.

El LHPLN sigue el mismo principio diagnóstico que el linfoma de Hodgkin, incluyendo el PET CT. El tratamiento, sin embargo, es similar al de linfomas B indolentes e incluye tratamientos con radioterapia, Rituximab o R-CVP en enfermedad localizada y R-CVP/R-ABVD en enfermedad avanzada sintomática o de alta masa tumoral.

13. LECTURAS RECOMENDADAS

Steven H. Swerdlow, Elias Campo, Stefano A. Pileri, Nancy Lee Harris, Harald Stein, Reiner Siebert, Ranjana Advani, Michele Ghielmini, Gilles A. Salles, Andrew D. Zelenetz, Elaine S. Jaffe; The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. Blood 2016; 127 (20): 2375–2390. doi: https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-6435.

Jaffe, E. S., Barr, P. M., & Smith, S. M. (2017). Understanding the New WHO Classification of Lymphoid Malignancies: Why It's Important and How It Will Affect Practice. American Society of Clinical Oncology educational book. American Society of Clinical Oncology. Annual Meeting, 37, 535–546. https://doi.org/10.1200/EDBK_175437.

Ramirez P, Ocqueteau M, Rodriguez A, et al. Outcomes in relapsed Hodgkin's lymphoma treated with autologous and allogeneic hematopoietic cell transplantation at the Pontificia Universidad Católica de Chile. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2015;37(3):184-189. doi:10.1016/j.bjhh.2015.03.011.

Díaz, Javier, Soto, Katherine, & Ernst, Daniel. (2017). Excelente respuesta a tratamiento con ABVD en pacientes con linfoma de Hodgkin localizado. Revista médica de Chile, 145(5), 619-622. https://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872017000500009.

Bachy E, Seymour JF, Feugier P, et al. Sustained Progression-Free Survival Benefit of Rituximab Maintenance in Patients With Follicular Lymphoma: Long-Term Results of the PRIMA Study. J Clin Oncol. 2019;37(31):2815-2824. doi:10.1200/JCO.19.01073.

Bartlett NL, Wilson WH, Jung SH, et al. Dose-Adjusted EPOCH-R Compared With R-CHOP as Frontline Therapy for Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Clinical Outcomes of the Phase III Intergroup Trial Alliance/CALGB 50303. J Clin Oncol. 2019;37(21):1790-1799. doi:10.1200/JCO.18.01994.

Crump M, Neelapu SS, Farooq U, et al. Outcomes in refractory diffuse large B-cell lymphoma: results from the international SCHOLAR-1 study [published correction appears in Blood. 2018 Feb 1;131(5):587-588]. Blood. 2017;130(16):1800-1808. doi:10.1182/blood-2017-03-769620.

Sehn LH, Salles G. Diffuse Large B-Cell Lymphoma. N Engl J Med. 2021;384(9):842-858. doi:10.1056/NEJMra2027612.

Lenz G, Staudt LM. Aggressive lymphomas. N Engl J Med. 2010;362(15):1417-1429. doi:10.1056/NEJMra0807082.

Fiore D, Cappelli LV, Broccoli A, Zinzani PL, Chan WC, Inghirami G. Peripheral T cell lymphomas: from the bench to the clinic. Nat Rev Cancer. 2020;20(6):323-342. doi:10.1038/s41568-020-0247-0.

Connors, J.M., Cozen, W., Steidl, C. et al. Hodgkin lymphoma. Nat Rev Dis Primers 6, 61 (2020). https://doi.org/10.1038/s41572-020-0189-

SECCIÓN 2.4 **HEMOSTASIA Y TROMBOSIS**

Capítulo 33. Trombocitopenias

Capítulo 34. Trombocitopatías

Capítulo 35. Enfermedad de Von Willebrand

Capítulo 36. Hemofilias y otras Alternaciones Hereditarias de la Coagulación

Capítulo 37. Alternaciones Adquiridas de la Coagulación

Capítulo 38. Trombofilias

Capítulo

33

TROMBOCITOPENIAS

Pamela Zúñiga C., Eduardo Fuentes Q., Diego Arauna, Iván Palomo G.

Resumen

1. Introducción

2. Trombocitopenias hereditarias
- 2.1. Clínica
- 2.2. Clasificación y diagnóstico
- 2.3. Trastornos plaquetarios hereditarios de especial relevancia clínica
  - 2.3.1. Síndromes de trombocitopenia relacionados con MYH9
  - 2.3.2. Trombocitopenia amegacariocítica congénita
  - 2.3.3. Síndrome de Wiskott-Aldrich
  - 2.3.4. Trastornos plaquetarios hereditarios con predisposición a neoplasias hematológicas
  - 2.3.5. Defectos del complejo GPIb/IX/V Síndrome Bernard Soulier
- 2.4. Manejo de pacientes con trastornos plaquetarios hereditarios

3. Trombocitopenias adquiridas

3.1. Trombocitopenias por disminución de la producción

3.1.1. Hipoplasia megacariocítica inducida por drogas

3.1.2. Hipoplasia megacariocítica asociada a infección viral

3.2. Trombocitopenias por aumento de la destrucción

3.2.1. Trombocitopenias inmunes

a) Trombocitopenias autoinmunes

a1) Púrpura trombocitopénico inmune primario

a2) Trombocitopenias inmunes secundarias

b) Trombocitopenias aloinmunes

b1) Púrpura aloinmune neonatal

b2) Púrpura post-transfusional

3.2.2. Trombocitopenias no inmunes

a) Púrpura trombótico trombocitopénico / síndrome hemolítico urémico

b) Trombocitopenia gestacional

c) Preeclampsia / eclampsia

d) Trombocitopenia asociada a infección

e) Trombocitopenia asociada a exposición a superficies no biológicas

3.3. Trombocitopenia por secuestro esplénico

3.4. Trombocitopenia dilucional

RESUMEN

Las trombocitopenias constituyen entidades clínicas de ocurrencia frecuente y que pueden obedecer a defectos de tipo hereditario o adquirido. Las trombocitopenias de origen hereditario se presentan como trombocitopenias aisladas en el período de recién nacido, habitualmente con alteraciones del tamaño de las plaquetas. Entre las trombocitopenias adquiridas se pueden distinguir aquellas por disminución de la producción de plaquetas como resultado de la supresión de la megacariopoyesis y las causadas por una disminución de la supervivencia plaquetaria, por mecanismos inmunes (auto o aloanticuerpos) y no inmunes. Raramente la trombocitopenia se debe al aumento del secuestro esplénico o a pérdida aguda de sangre sin reemplazo de plaquetas.

1. INTRODUCCIÓN

La disminución del número de plaquetas (trombocitopenias) es una condición clínica frecuente que se pueden originar por defectos de tipo hereditario o presentarse en forma adquirida. Especialmente entre las condiciones adquiridas, el desorden puede afectar aisladamente a las plaquetas o acompañar las manifestaciones clínicas de otras patologías. Este capítulo contiene una clasificación general de las trombocitopenias, con un análisis de la patogenia, fisiopatología y clínica de los defectos más relevantes.

2. TROMBOCITOPENIAS HEREDITARIAS

Las trombocitopenias congénitas (TC) son un grupo heterogéneo de trastornos, caracterizados por una disminución del recuento plaquetario, secundario a mutaciones en los genes responsables de la megacariopoyesis. La rareza de las TC y las dificultades para su diagnóstico, han complicado los estudios poblacionales, por lo que se desconoce su real prevalencia.

2.1. Clínica

El espectro clínico de las TC va desde trombocitopenias leves, asintomáticas, que se presentan como un hallazgo en un examen de rutina o con sangrado anormal inesperado ante un examen de hemostasia, hasta pacientes con trombocitopenia grave, con síntomas precoces de sangrado, pasando por distintos grados de sangrado mucocutáneo (SMC) que incluso pueden disminuir o desaparecer con la edad.

Algunas TC se acompañan de un fenotipo característico, que orienta el diagnóstico en período de recién nacido, como el síndrome de Trombocitopenia

con Ausencia de Radio (TAR) o pueden desarrollar otras patologías asociadas, como los trastornos asociados a mutaciones del gen MYH9, en que los pacientes presentan distintos grados de nefritis, sordera o cataratas.

En el caso de TC sin otros síntomas asociados, puede plantearse el diagnóstico diferencial con Púrpura Trombocitopénico Inmune (PTI) resistente a tratamiento inmunosupresor, motivo por el cual es importante un exhaustivo estudio de exámenes previos y antecedentes familiares que pueden ayudar a plantear el diagnóstico de TC.

Desde el punto de vista clínico, es importante observar el recuento de plaquetas en relación a la sintomatología, ya que los síntomas desproporcionados al estímulo deben hacer sospechar disfunción plaquetaria agregada, que puede ser importante, por ejemplo en el síndrome de Bernard Soulier.

Desde 2011, la técnica de secuenciación de nueva generación (Next Generation Sequencing NGS) ha permitido un mejor acceso para identificar los genes implicados en la menor producción o disminución de la vida media de las plaquetas en pacientes portadores de TC. De esta manera se puede hacer un diagnóstico genético específico en pacientes que antes solo tenían una clasificación clínica.

2.2. Clasificación y Diagnóstico

Las TC se pueden clasificar según el tamaño plaquetario (volumen plaquetario medio o VPM), por lo cual, es importante que el frotis de un paciente con TC sea evaluado por un profesional con experiencia que pueda analizar el aspecto general, el tamaño plaquetario y la presencia de inclusiones en leucocitos. Según estos hallazgos podemos ir acotando el diagnóstico (Tabla 33-1).

Hoy en día, el diagnóstico molecular es más accesible, debido a NGS, ya que esta técnica ha facilitado la secuenciación de genes implicados, logrando un diagnóstico en aproximadamente 54% de las TC.

Esto es importante, ya que los pacientes con TC pueden no representar un problema desde el punto de vista hemostático, pero la mutación que origina la trombocitopenia puede determinar una predisposición al desarrollo de malignidad hematológica o insuficiencia de la médula ósea (Mielofibrosis o Aplasia Medular), lo cual hace plantear un seguimiento estrecho para detectar y tratar precozmente estas complicaciones.

Por otra parte, particularmente en los tipos graves y potencialmente fatales, en los que el genotipo está relacionado con el pronóstico y la gravedad de la enfermedad, como es el síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS), es posible que se plantee precozmente la posibilidad de Trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) y es importante tener una certeza del diagnóstico para poner en la balanza riesgo / beneficio de la terapia.

Tabla 33- 1. Clasificación de las Trombocitopenias congénitas según el tamaño plaquetario.

Plaquetas pequeñas (VPM menor a 7 fl)
- Síndrome de Wiskott-Aldrich
- Trombocitopenia ligada al cromosoma X
Plaquetas tamaño normal (VPM entre 7-11 fl)
- Trombocitopenia amegacariocítica congénita(CAMT)
- Trombocitopenia y radios ausentes (TAR)
- Sinostosis Radiocubital con trombocitopenia amegacariocítica (RUSAT))
- Trastorno plaquetario familiar / leucemia mieloide aguda (FPD/AML)
- Trombocitopenia relacionada a ANKRD26, CYCS, ANKRD26 y CYCS
Plaquetas grandes (VPM mayor 11 fl)
- Trastornos relacionados con MYH9:
Anomalía de May-Hegglin
Síndrome de Sebastián
Síndrome de Fechtner
Síndrome de Epstein
- Trombocitopenia mediterránea
- Síndrome de Bernard-Soulier (BSS)
- Síndrome velocardiofacial / DiGeorge (VCFS)
- Mutación GATA1
- Síndrome de las plaquetas grises (GPS)
- Trombocitopenia ligada al X con diseritropoyesis (XLT)
- Trombocitopenia por Pseudo von Willebrand (PT-VWD)
- Síndrome Paris-Trousseau (Jacobsen)
- Trombocitopenia relacionada a TUBB1
- Trombocitopenia relacionada a sitosterolemia

Otra forma de clasificar, que puede ser complementaria, es según el tipo de herencia. Esto es especialmente claro en TC de herencia dominante ya que en el caso de la herencia recesiva nuestro paciente podría ser el primer caso en su familia. Es importante hacer un genograma considerando los recién nacidos o lactantes fallecidos que pueden haber sido afectados por complicaciones graves derivadas de la misma enfermedad (Tabla 33-2).

Tabla 33-2. Clasificación de las Trombocitopenias congénitas según herencia

Autosómico Dominante
- Anomalía de May-Hegglin
- Síndrome de Fechtner
- Síndrome de Epstein
- Síndrome de Sebastián
- Trombocitopenia mediterránea / portador de Bernard-Soulier
- Trastorno plaquetario familiar / leucemia mieloide aguda
- Cromosoma 10 / THC2
- Trombocitopenia de Paris-Trousseau / síndrome de Jacobsen
- Síndrome de las plaquetas grises
- Trombocitopenia y sinostosis radial
Autosómico Recesivo
- Trombocitopenia amegacariocítica congénita (CAMT)
- Síndrome de Bernard-Soulier
Ligado al Cromosoma X
- Síndrome de Wiskott-Aldrich
- Trombocitopenia ligada al cromosoma X
- Mutación GATA1

Otra clasificación está dada por los hallazgos asociados o TC sindromáticas (Tabla 33-3), donde las características asociadas pueden no ser tan evidentes, por lo que requieren un alto grado de sospecha, para hacer exámenes tendientes a aclarar el síndrome.

Tabla 33-3. Trombocitopenias congénitas según hallazgos asociados - Sindromáticos

Síndrome	Hallazgos asociados
Anomalía de May-Hegglin	Inclusiones de neutrófilos, hipoacusia neurosensorial, nefritis, cataratas
Síndrome velocardiofacial / de DiGeorge (CATCH22)	Anomalías cardíacas, faciales, paratiroideas y del timo, deterioro cognitivo / del aprendizaje
Trastorno plaquetario familiar / leucemia mieloide aguda	Mielodisplasia, leucemia mieloide aguda
Trombocitopenia de Paris-Trousseau / síndrome de Jacobsen	Retraso psicomotor, anomalías faciales (síndrome de Jacobsen)
Trombocitopenia amegacariocítica congénita	Insuficiencia medular durante la segunda década
Trombocitopenia y radios ausentes	Radios acortados / ausentes bilateralmente
Trombocitopenia y sinostosis radial	Radio fusionado, rango de movimiento incompleto
Síndrome de Wiskott-Aldrich	Inmunodeficiencia, eccema, linfoma
Mutación GATA-1	Anemia, diseritropoyesis, talasemia

2.3. Trastornos plaquetarios hereditarios de especial relevancia clínica

2.3.1. Síndromes de trombocitopenia relacionados con MYH9

Corresponden a la principal causa de trombocitopenia hereditaria. El gen mutado en estas 4 macrotrombocitopenias es el cromosoma 22q12-13, y corresponde a MYH9, que codifica la cadena pesada de miosina no muscular IIA. Las inclusiones citoplasmáticas en los neutrófilos corresponden a la proteína NMMHC-IIA mutada.

Si bien está descrito como herencia autosómica dominante, el 40% de las personas con enfermedad relacionada al gen MYH9, se debe a defectos moleculares con penetrancia incompleta o que aparecen "de novo" por lo que puede no haber antecedentes familiares.

Este síndrome incluye la anomalía de May-Hegglin, síndrome de Fechtner, síndrome de Sebastián, síndrome de Epstein.

Estos síndromes se caracterizan por macrotrombocitopenia leve a moderada. En el frotis de sangre periférica se observan "plaquetas gigantes", es decir, aumentadas de tamaño, con un valor de VPM > 12 fl,. Además de las inclusiones características de los neutrófilos.

El diagnóstico clínico diferencial, dentro de este síndrome, se hace por la presencia de anomalías asociadas (tabla 33-4).

El curso clínico de MYH9 es heterogéneo, los eventos de sangrado son en general, leves o ausentes. En el caso de pacientes con trombopenia importante, menor de 50,000/µLo con un fenotipo sangrador, que tengan un desafío hemostático como cirugía o trauma, puede utilizarse como terapia transfusión de plaquetas, o si el tiempo lo permite, agonistas del receptor de trombopoyetina (TPO-RA), en general con buena respuesta.

La mayor complicación radica en que el 25% de los pacientes desarrollan nefropatía con proteinuria, que en la mayoría de los casos, evoluciona a insuficiencia renal terminal, el 50% de los pacientes presentan sordera neurosensorial y el 18% cataratas preseniles.

Específicamente en estos pacientes, existe una correlación genotipo-fenotipo lo cual puede orientar a establecer estrategias o tratamientos precoces para prevenir o retrasar el desarrollo de anomalías asociadas.

Tabla 33-4. Clasificación de los Síndromes de trombocitopenia relacionados con MYH9.

Síndrome	Macro-trombocitopenia	Inclusiones en neutrófilos	Hipoacusia neurosensorial	Nefritis	Cataratas
Anomalía de May-Hegglin	presente	presente	ausente	ausente	ausente
Síndrome de Sebastián	presente	presente	ausente	ausente	ausente
Síndrome de Fechtner	presente	presente	presente	presente	presente
Síndrome de Epstein	presente	presente	presente	presente	ausente

2.3.2. Trombocitopenia amegacariocítica congénita

La Trombocitopenia amegacariocítica congénita (CAMT) corresponde a una TC con hipoplasia o ausencia de megacariocitos, sin otras características físicas.

Este trastorno autosómico recesivo está causado mayormente por mutaciones en el gen c-MPL lo que se traduce en un receptor de trombopoyetina disfuncional.

El estudio molecular es fundamental, ya que en la mayoría de los casos la causa es mutación de c-MPL que se relacionan con otras citopenias con progresión a aplasia medular. El trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) es la única opción curativa para estos pacientes. Se han descrito algunos casos con síntomas clínicos muy similares, causados por mutaciones bi alélicas en el gen THPO que codifica para trombopoyetina, donde en estos pacientes el TPH no es una opción de tratamiento, ya que el defecto se encuentra en la trombopoyetina, por lo cual deben tratarse con TPO-RA.

2.3.3. Síndrome de Wiskott-Aldrich

El Síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) es una enfermedad ligada al cromosoma X, que se manifiesta en varones, con ausencia de sintomatología clínica en mujeres portadoras.

Se debe a un defecto del gen WAS (Xp11.22) que codifica la proteína WASP que participa en la remodelación citoesquelética de actina. Se ha informado de una relación entre el curso clínico y el genotipo, donde las mutaciones que tienen el mayor efecto sobre la expresión de WASP se asocian con un fenotipo más grave.

Clínicamente se caracteriza por trombocitopenia precoz, sintomática, con sangrado de distinta magnitud. Hemograma muestra trombocitopenia de entre 5 y 50 × 10 9 / L, con plaquetas pequeñas (VPM 3,5 - 7 fl.) además presentan simultánea o sucesivamente manifestaciones de eccema, inmunodeficiencia adaptativa e innata y autoinmunidad.

Las infecciones recurrentes o por gérmenes oportunistas son la principal causa de muerte en estos pacientes.

A largo plazo presentan un mayor riesgo de neoplasias, especialmente linfoma.Las mutaciones hipomórficas del gen WAS pueden conducir a una forma atenuada de WAS denominada trombocitopenia ligada al cromosoma X (XLT) crónica o intermitente.

El tratamiento de apoyo en WAS incluye antibióticos, terapia de reemplazo de inmunoglobulinas, alimentación con leche hipoalergénica, esteroides tópicos para el eccema y tratamiento temprano y agresivo de las complicaciones autoinmunes. En caso necesario el TPO-RA puede usarse para aumentar temporalmente el recuento de plaquetas. El único tratamiento curativo es TPH.

2.3.4. Trastornos plaquetarios hereditarios con predisposición a neoplasias hematológicas

La revisión de 2016 de la OMS sobre la clasificación de neoplasias mieloides y leucemias agudas, introdujo el término de **neoplasias mieloides con predisposición**

de la línea germinal y trastornos plaquetarios preexistentes, que incluye aquellos que evolucionan con variantes moleculares en el gen de dominio de repetición 26 de anquirina (ANKRD26) o sobre los factores de transcripción ETV6 y RUNX1.

Se presenta como trombocitopenia leve, aislada, no sindrómica, con plaquetas de tamaño normal. El exmen de la médula ósea muestra megacariocitos, con características displásicas. Mientras los pacientes con ANKRD26 y ETV6 presentan trombocitopenia moderada con escasa o mínima clínica de sangrado, los pacientes con RUNX1, también llamado Trastorno Plaquetario familiar con propensión a la leucemia mieloide aguda (FPD / AML) suele asociarse a disfunción plaquetaria lo que determina una clínica hemorrágica importante.

La característica común y clínicamente relevante de estas tres condiciones es el mayor riesgo de neoplasias hematológicas. Las neoplasias suelen debutar entre la segunda y la quinta década de la vida, mientras que la trombocitopenia suele estar presente al nacer.

2.3.5. Defectos del complejo GPIb/IX/V Síndrome Bernard Soulier

Se debe a mutaciones en los genes GP1BA, GP1BB y GP9. Se han descrito más de 100 mutaciones diferentes, lo que lleva a la ausencia del complejo Ib / IX / V en las plaquetas, y también algunos casos de una variante con expresión de un receptor no funcional.

De herencia autosómica recesiva, solo los pacientes homocigotos presentan síntomas de sangrado, especialmente mucocutáneo que puede ser grave y de inicio precoz.

Se caracteriza por trombocitopenia moderada o grave y plaquetas gigantes disfuncionales.

En el laboratorio presenta agregación plaquetaria con todos los antagonistas (Araquidonato, ADP y Colágeno) pero no agrega con Ristocetina.

Una deleción heterocigótica del cromosoma 22q11.2, principalmente somática, incluida la GP1BB, causa síndromes de Di-George y velocardiofaciales en los que la macrotrombocitopenia se acompaña de varios defectos del desarrollo.

2.4. Manejo de pacientes con trastornos plaquetarios hereditarios

Una vez realizado el diagnóstico es importante que el paciente sea tratado en un centro especializado en manejo de coagulopatías, donde junto a su familia puedan recibir un manejo y seguimiento integral, el cual incluye:

a) Evitar situaciones que pudieran facilitar el sangrado
En los pacientes graves es importante evitar actividades que aumenten riesgo de trauma y estimular activamente los deportes sin impacto.

Los medicamentos que puedan agregar riesgo de sangrado como aspirina y otros antiinflamatorios no esteroides, algunos antidepresivos, antibióticos y anestésicos, deben prescribirse en pacientes graves y evitarse en la mayoría de los pacientes con TC.

La higiene bucal precisa y las visitas dentales periódicas evitan la necesidad de procedimientos dentales invasivos a futuro.

Respecto a la dieta, existen alimentos con efecto antiplaquetario documentado in vitro (cáscara de tomate, berries, cacao, etc), sin embargo, no hay trabajos in vivo que muestren el efecto del cambio de dieta en estos pacientes.

b) Educación en relación al manejo de sangrado mucocutáneo
Es importante empoderar a la familia y luego al paciente, en manejo en domicilio de sangrado, utilizando medidas de compresión y frío local, el uso de tapones absorbibles para taponamiento nasal y ácido tranexámico tópico.

c) Transfusión de plaquetas
Es importante tener claridad de los riesgos de esta terapia, ya que en varias TC existe un riesgo aumentado de aloinmunización.

La indicación de transfusión profiláctica antes de la cirugía o el parto debe evaluarse cuidadosamente, ya que pudiera significar un aumento del riesgo de refractariedad a transfusión de plaquetas. En este contexto, los pacientes afectados de TC sin disfunción plaquetaria, debieran regirse según las guías locales de transfusión de plaquetas, en general, se recomienda un recuento de plaquetas de al menos 50 x10 9 / L para la mayoría de las cirugías mayores, mientras que para la neurocirugía o cirugía ocular posterior, se requiere un recuento de plaquetas de al menos 100 x10 9/L. Los pacientes con disfunción plaquetaria agregada, no deben regirse por estos valores y en caso necesario, deben recibir transfusión aun estando con recuentos sobre los niveles antes descritos.

En el caso de pacientes con TC que se asocie a inmunosupresión o que sean candidatos a TPH deben considerarse transfusiones de derivados sanguíneos irradiados y filtrados.

d) Fármacos hemostáticos coadyuvantes.
Ácido Tranexánico y Desmopresina. Los antifibrinolíticos como el ácido tranexámico, pueden ayudar especialmente en el caso de sangrado mucoso, la dosis recomendada es 10-15 mg / kg cada 8 horas. La Desmopresina (1-desamino-8-D-arginina vasopresina, DDAVP) análogo de la vasopresina, además de aumentar los niveles de Factor von Willebrand y Factor VIII plasmático, ha mostrado mejorar la función plaquetaria en ciertos escenarios. Ambos medicamentos deben ser evaluados en el manejo individual y deben agotarse como medida previa a la transfusión de plaquetas.

Factor VII recombinante (rFVIIa). Su uso está autorizado por la FDA para Enfermedad de Glanzmann, pero existen reportes de uso en distintas TC con

refractariedad a transfusión de plaquetas, especialmente de urgencia, ya que aumenta la generación de trombina.

TPO-RA (Eltrombopag, Romiplostin). Algunas TC podrían responder a miméticos de trombopoyetina, pero la evidencia es aún escasa. El uso en pacientes con riesgo de malignidad, especialmente en el uso crónico está cuestionado. Podría ser una alternativa a considerar para preparar pacientes que tienen nivel crítico de plaquetas para un procedimiento o cirugía programados, ya que tiene una latencia en su efecto.

e) Tratamiento hormonal.
Una mención especial requiere el manejo del sangrado menstrual excesivo (SME) ya que muchas mujeres son diagnosticadas al momento de la menarquia o por presentar SME. Es importante manejar precozmente este síntoma, para evitar complicaciones como deterioro de la calidad de vida, déficit de hierro crónico, anemia crónica o incluso aguda. Dentro de las alternativas están además el uso de antifibrinolíticos.

f) Control clínico dirigido a la búsqueda y manejo de complicaciones asociadas.
Si bien, la mayoría de las veces, no se puede evitar aparición de complicaciones, el manejo precoz puede cambiar el curso y la progresión. En el caso de los pacientes MYH9-RD la aparición de proteinuria puede apoyar el uso de terapias como los bloqueadores de los receptores de angiotensina II (ARB-II) y / o los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA), con el objetivo de retrasar la insuficiencia renal.

En el caso de TC con predisposición a malignidad, como las TC con mutaciones RUNX1, ANKRD26 o ETV6, se recomienda un examen citogenético de la médula ósea en el momento del diagnóstico, si no hay signos de malignidad, seguimiento clínico y con hemograma anual o semestral, con examen citogenético de médula ósea programado o en caso de demostrarse alteraciones al hemograma.

Como ya comentamos, el curso clínico de las TC es heterogéneo, desde el punto de vista de la coagulopatía es posible que muchos pacientes tengan un curso benigno o asintomático o solo requieran manejo de sangrado mucocutáneo con medidas generales, especialmente en la infancia, ya que la mayoría de las veces los síntomas van disminuyendo con la edad. Es por esto que la urgencia de un tratamiento curativo es relativa y debe evaluarse caso a caso.

La terapia génica en las TC está en desarrollo y aún se encuentra en etapa preclínica, es así que el único tratamiento curativo disponible actualmente para las TC es el TPH. Como este tratamiento aún significa riesgo de morbimortalidad importante, se reserva para las TC con síntomas hemorrágicos graves, con alto riesgo de transformación a aplasia de médula ósea o neoplasia maligna hematológica.

3. TROMBOCITOPENIAS ADQUIRIDAS

Las trombocitopenias adquiridas se pueden explicar por disminución de la producción de plaquetas, aumento de su destrucción, secuestro esplénico de las mismas y dilución durante la transfusión masiva de sangre (Tabla 33-5).

3.1. Trombocitopenias por disminución de la producción

La trombocitopenia adquirida por disminución de la producción se observa en forma frecuente y predecible en la aplasia medular, infiltración maligna de la médula ósea, quimioterapia y radiación. Asimismo, la trombocitopenia es parte de la pancitopenia observada en deficiencias nutricionales de folato, vitamina B12 y, ocasionalmente, hierro. Estas condiciones se discuten en otros capítulos de este libro. Analizamos aquí aquellos cuadros en que la trombocitopenia resulta de una reducción selectiva o ausencia de megacariocitos en la médula ósea, con presencia normal de las otras series hematopoyéticas. La aplasia o hipoplasia megacariocítica pura adquirida, puede ser secundaria, entre otras causas, a fármacos, infecciones y alteraciones inmunológicas (tabla 33-5).

Tabla 33-5. Clasificación de las trombocitopenias adquiridas

Por disminución de la producción de plaquetas
Hipoplasia/aplasia megacariocítica
Infecciones virales
Fármacos y alcohol
Por aumento de la destrucción de plaquetas
Mecanismos inmunológicos
Trombocitopenias autoinmunes
Trombocitopenia inmune primaria
Trombocitopenias inmunes secundarias
Trombocitopenias aloinmunes
Púrpura aloinmune neonatal
Púrpura post-transfusional
Mecanismos no inmunológicos
Púrpura trombótica trombocitopénica
Síndrome hemolítico urémico
Trombocitopenia gestacional
Trombocitopenia asociada a infecciones
Por secuestro esplénico de plaquetas
Por pérdidas y dilución durante la transfusión masiva de sangre

3.1.1. Hipoplasia megacariocítica inducida por drogas

Muchos fármacos pueden producir trombocitopenia al reducir la celularidad de la médula ósea (hipoplasia o aplasia) o interfiriendo con la maduración

celular. La supresión de la médula ósea puede deberse a los efectos directos del fármaco sobre los megacariocitos o sus progenitores, o también a efectos indirectos sobre el microambiente de la médula ósea y los reguladores hematopoyéticos. La trombocitopenia aparece posterior al inicio del tratamiento con el fármaco; este no tiene efecto sobre las plaquetas en circulación.

Las drogas que con mayor frecuencia se asocian a esta condición son clorotiazida, alcohol y estrógenos. En individuos susceptibles, la clorotiazida puede inducir una trombocitopenia leve o moderada que se recupera espontáneamente en alrededor de dos semanas después de retirar el fármaco. La ingestión de grandes cantidades de alcohol puede causar una supresión selectiva de la producción de plaquetas, con trombocitopenia leve a moderada, que se puede agravar por la presencia simultánea de esplenomegalia, desnutrición o insuficiencia hepática. El uso prolongado de dietilestilbestrol u otros preparados de estrógenos se asocia ocasionalmente a trombocitopenia en personas susceptibles, la cual puede tardar hasta dos meses en recuperarse después de la suspensión de la hormona. Otro factor causante de hipoplasia megacariocítica es la quimioterapia antineoplásica, lo cual limita la dosis del fármaco y la frecuencia de administración. El riesgo de hipoplasia depende del tipo quimioterapéutico y tipo de cáncer, donde la terapia basada en gemcitabina y platino para tumores sólidos, son lo que con mayor frecuencia causan esta condición. Los antibióticos como la vancomicina y linezolid, junto con algunos agentes antivirales y el interferón, además de agentes inmunosupresores como tacrolimus, pueden inducir trombocitopenia por toxicidad directa en la médula ósea.

3.1.2. Hipoplasia megacariocítica asociada a infección viral

Varios tipos de infecciones virales son capaces de afectar selectivamente la trombopoyesis. Destaca la infección por virus del sarampión, varicela, citomegalovirus, mononucleosis infecciosa y dengue. Ocasionalmente el virus de la hepatitis B puede producir una trombocitopenia amegacariocítica aislada. Desde el punto de vista morfológico, la trombocitopenia asociada a infección viral se caracteriza por vacuolización de los megacariocitos, inclusiones y degeneración nuclear. En algunas infecciones virales (rubéola, varicela) la trombocitopenia puede ser agravada por la destrucción periférica de las plaquetas por acción de complejos inmunes. El mecanismo viral puede estar asociado a una infección directa sobre los megacariocitos o células madre hematopoyéticas de la médula ósea (induciendo apoptosis), lo que promueve una producción alterada de citoquinas y una disminución del número de células progenitoras.

3.2. Trombocitopenias por aumento de la destrucción

La remoción acelerada de las plaquetas desde la circulación obedece a dos grandes mecanismos. Uno de ellos es inmunológico (destrucción plaquetaria es mediada por anticuerpos y/o complejos inmunes) y el otro mecanismo es no inmunológico (aumento de consumo).

3.2.1. Trombocitopenias inmunes

Las plaquetas pueden ser retiradas prematuramente de la circulación por mecanismos inmunes en los que pueden participar autoanticuerpos o aloanticuerpos. El denominador común de todos estos procesos es un retiro acelerado de las plaquetas de la circulación, con acortamiento de la supervivencia, lo que se traduce en una disminución del número de plaquetas circulantes (trombocitopenia).

a) Trombocitopenias autoinmunes

Las trombocitopenias pueden ser primarias o secundarias a otras enfermedades.

a1) Púrpura trombocitopénico inmune primario

El púrpura trombocitopénico inmune primario (PTI) es una de las causas más frecuentes de trombocitopenia autoinmune aislada. Es causada por autoanticuerpos isotipo IgG que se unen a estructuras de la membrana plaquetaria, produciendo una menor vida media en circulación, con recuento de plaquetas bajo de 100x103/µL y presencia de trastornos hemorrágicos. En la figura 33-1 se muestra la patogénesis de las trombocitopenias autoinmunes.

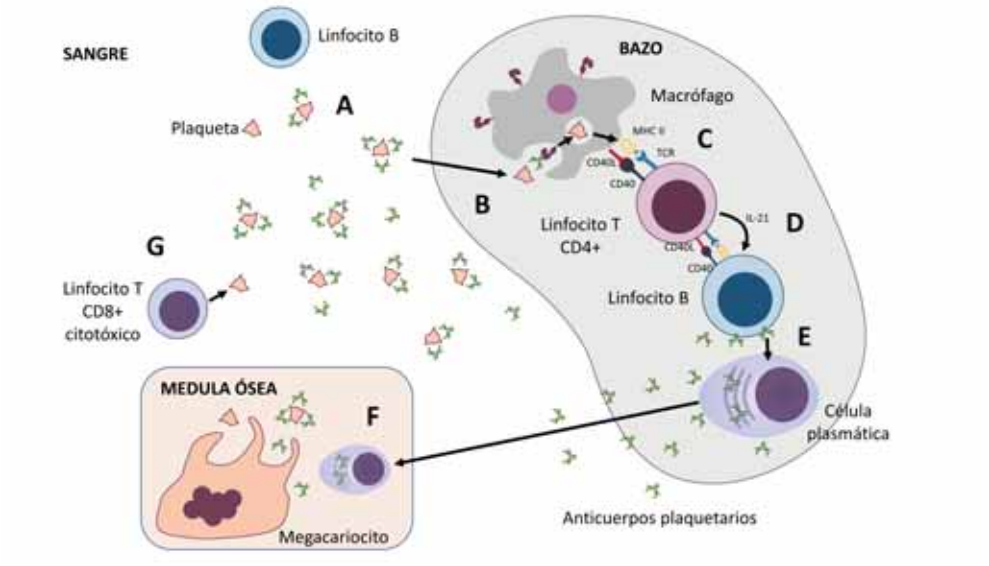


Figura 33-1 Fisiopatología de las Trombocitopenias Inmunes. (A) Las plaquetas circulantes son opsonizadas por anticuerpos antiplaquetarios. (B) Mediante la circulación llegan al bazo, donde son internalizadas por los macrófagos que expresan el FcγR. (C) Estas plaquetas son degradadas por los macrófagos que posteriormente presentan péptidos derivados de los antígenos plaquetarios a las células T CD4+ autorreactivas que interactúan con las células B. (D) Las células B autorreactivas se diferencian en células plasmáticas productoras de anticuerpos antiplaquetarios. (E) Las células plasmáticas pueden permanecer en el bazo o migrar a la médula ósea, (F) donde provocan la apoptosis de megacariocitos, debido a que expresan glicoproteínas plaquetarias como GPIIb/IIIa o GPIb/IX. (G) Los linfocitos T CD8+ generan citotoxicidad directa sobre las plaquetas en la circulación. Tomado/Adaptado de "Epidemiology and Clinical Manifestations of Immune Thrombocytopenia" Kohli, Hamostaseologie, 2019.

La presentación clínica es muy variable, desde casos agudos muy sintomáticos a hallazgos de trombocitopenia leve asintomática. Esto último se explica porque las plaquetas circulantes son funcionalmente normales. Debido a sus diferencias clínicas, terapéuticas y posiblemente fisiopatológicas, se discutirá en forma separada el PTI crónico y agudo.

Púrpura trombocitopénico inmunológico agudo

El PTI agudo es una enfermedad habitualmente de los niños, que se presenta comúnmente con una historia corta de sangrado mucocutáneo en niños de 2 a 10 años de edad, de cualquier sexo (Tabla 33-6). En cuanto a la incidencia, afecta aproximadamente a 3/100.000 niños cada año en todo el mundo. La mayoría experimentará un breve curso de trombocitopenia, con o sin sangrado, y se recuperará por completo en 12 meses. Es muy frecuente el antecedente de una infección viral reciente o vacunación. Con recuentos de plaquetas menores a 20.000/μL al examen físico muestra petequias, equimosis y signos de sangrado mucoso. Ocasionalmente se puede presentar sangrado gastrointestinal o genitourinario (<2% de los casos). En la etapa aguda existe riesgo de hemorragia intracraneana, aunque este es bajo (<1%). La evolución característica de la PTI aguda en la infancia es hacia la remisión espontánea, la que se alcanza en un promedio de 1 a 2 meses en el 80% de los casos. El diagnóstico de PTI agudo del niño está basado principalmente en la historia, examen físico, y hemograma (para excluir otras causas de trombocitopenia aguda). Pruebas adicionales, como estudio de anticuerpos antiplaquetarios, no son necesarias. Además el estudio de la médula ósea se debería reservar para pacientes con trombocitopenia persistente o resistentes al tratamiento.

Patogenia. La estrecha relación entre el desarrollo de PTI agudo e infección viral ha llevado a proponer una serie de mecanismos que tienen relación con este tipo de infecciones para explicar la destrucción de las plaquetas: (a) interferencia del virus con la maduración de los megacariocitos, (b) reactividad cruzada de anticuerpos anti-virales con las plaquetas, (c) unión de complejos inmunes virus-antivirus a la superficie plaquetaria y (d) producción de autoanticuerpo antiplaquetario (mimetismo antigénico). Este último mecanismo es el que ha encontrado mayor evidencia experimental; de hecho, se ha demostrado producción de IgG por parte de linfocitos de niños con PTI agudo dirigidos a epítopos como GPIb/IX y GPIIb/IIIa, esto debido a la similitud de los epítopos de la superficie viral con las glicoproteínas de membrana de las plaquetas. Los autoanticuerpos, además de tener especificidad antiplaquetaria, pueden unirse y activar células mononucleares esplénicas (presentan receptor Fcγ) y otros tejidos del sistema de fagocitos mononucleares, lo que da como resultado un aumento de la fagocitosis y la destrucción plaquetaria. Los anticuerpos antiplaquetarios también pueden fijar el complemento que conduce a un aumento de la lisis plaquetaria y la fagocitosis.

Tratamiento. La mayoría de los niños portadores de PTI agudo no requieren tratamiento específico; de hecho, alrededor del 80% de ellos evoluciona a la remisión completa sin tratamiento dentro de los seis meses de iniciado el cuadro, ya que al resolverse la infección viral se elimina el estímulo principal para la producción de anticuerpos. La vida media de la IgG es de aproximadamente 3 semanas y el título de anticuerpos disminuye gradualmente, seguido de la recuperación del recuento de plaquetas, lo que explica el curso clínico de la PTI en la mayoría de los niños. La persistencia de la destrucción plaquetaria en aproximadamente el 20% de los niños y en la mayoría de los adultos (PTI crónica) se relaciona con alteraciones en la regulación de linfocitos T. Pacientes con recuentos de plaquetas >20x10^3/µL no se deberían hospitalizar si están asintomáticos o presentan solo púrpura leve. Tratamiento específico estaría indicado en pacientes que tienen <20x10^3 plaquetas/µL o en aquellos con recuentos <50x10^3 plaquetas/µL pero con sangrado mucocutáneo significativo. En estos casos el uso de corticosteroides ha mostrado algún beneficio. En varios estudios que han utilizado dosis altas de corticosteroides, se ha observado recuperación del recuento de plaquetas similar al obtenido con el uso de inmunoglobulina intravenosa (IgIV). Se ha demostrado que la globulina anti-Rh(D) intravenosa aumenta el recuento de plaquetas en forma significativa en el PTI agudo del niño; sin embargo, la velocidad de recuperación pareciera ser menor que la obtenida con el uso de IgIV. En caso de que PTI se vuelva persistente con trombocitopenia grave y/o hemorragia, y ya no responde a las tres terapias de primera línea, se recomienda el uso de agonistas del receptor de trombopoyetina o rituximab. La esplenectomía estaría indicada cuando la trombocitopenia persiste por más de 12 meses después del diagnóstico, con síntomas de sangrado y recuento de plaquetas <10 x10^3/µL, asumiendo falla o respuesta transitoria al uso de IgIV o anti-Rh(D).

Púrpura trombocitopénico inmune crónico

El PTI crónico es un trastorno hemorrágico relativamente común caracterizado por trombocitopenia aislada, que puede afectar a personas de todas las edades (preferentemente adultos), razas y sexos. Se caracteriza clínicamente por la aparición de hemorragias mucocutáneas (equimosis espontáneas, epistaxis y menorragia, entre otras manifestaciones). Una de las distinciones epidemiológicas mejor documentadas entre el PTI infantil y adulto es el predominio de mujeres (proporción ~ 2:1), donde este aumento de PTI crónica está relacionado con el aumento de la incidencia de enfermedad autoinmune sistémica en mujeres adultas (tabla 33-6).

Tabla 33-6. Diferencias entre PTI agudo y crónico

Características	PTI aguda	PTI crónica
Edad de comienzo	2 – 9 años	20 – 40 años
Mujeres: Hombres	1 : 1	2 : 1
Antecedente de infección	Presente	Ausente
Recuento de plaquetas	< $20x10^3$/µL	$20x10^3$ – $100x10^3$/µL
Inicio de síntomas	Abrupto	Gradual
Duración	2 – 6 semanas	Años
Remisión espontánea	> 80% de los casos	Infrecuente

Etiología y patogenia. La PTI es causada por la destrucción autoinmune de las plaquetas, debido a los anticuerpos anti-glicoproteínas plaquetarias. La trombocitopenia sería el resultado de un aumento en la destrucción extravascular de las plaquetas sensibilizadas con dichos anticuerpos a nivel del sistema fagocítico mononuclear (SFM), especialmente en el bazo. Sin embargo, estudios cinéticos realizados en pacientes con PTI crónico, han demostrado también una respuesta inapropiada de la médula ósea, con grados variables de disminución de la megacariopoyesis. Estudios inmunohematológicos muestran en forma consistente que sobre el 90% de los casos de PTI crónico presentan anticuerpos antiplaquetarios de isotipo IgG, aislados o en combinación con IgM o IgA. Los anticuerpos antiplaquetarios se detectan en aproximadamente el 60% de los pacientes y son más comúnmente dirigidos contra la GPIIb-IIIa; sin embargo, también se han descrito anticuerpos contra la GP Ib-IX y otras (GP Ia-IIa y GPIV). Debido a que los megacariocitos en la médula ósea expresan glicoproteínas plaquetarias como GP IIb-IIIa y GPIb-IX, los autoanticuerpos contra estos antígenos afectan la producción de plaquetas contribuyendo a la apoptosis de megacariocitos. Además de estos mecanismos dependientes de anticuerpos, los linfocitos T CD8+ circulantes también causan trombocitopenia por citotoxicidad directa. Puesto que las GP mayores (GP IIb-IIIa y GP Ib-IX) son importantes receptores funcionales, es posible observar defectos en la adhesión y/o agregación plaquetaria asociados a la presencia de los citados autoanticuerpos. Este fenómeno se ha observado en pacientes en que, a pesar de mostrar un aumento en el recuento de plaquetas, persisten los síntomas de sangrado.

Diagnóstico. Los elementos fundamentales en los que se basa el diagnóstico del PTI crónico en el adulto son la historia, el examen físico y hemograma. La historia clínica tiene como objetivos determinar el tipo y gravedad del sangrado mucocutáneo, así como descartar el uso de fármacos que potencialmente pueden producir trombocitopenia o agravar las manifestaciones clínicas de la enfermedad (ej. aspirina). El examen físico está dirigido a evaluar las manifestaciones de sangrado, su gravedad y a excluir otras causas de trombocitopenia. El hemograma debe mostrar solo trombocitopenia; las otras dos series deben estar normales. Es importante descartar la pseudotrombocitopenia, que en la mayoría de los casos

resulta de la aglutinación in vitro de las plaquetas en presencia de EDTA. Si la historia clínica, el examen físico y el hemograma son compatibles con el diagnóstico de PTI, no se considera necesario el uso de otras pruebas de laboratorio. Se recomiendan pruebas de rutina de VIH y del virus de la hepatitis C (VHC) en pacientes con factores de riesgo, y pruebas de Helicobacter pylori si corresponde al caso. Realizar mielograma solo está indicado en las siguientes circunstancias: pacientes mayores de 60 años, antes de esplenectomía, recaída después de la remisión y fracaso del tratamiento de primera línea. El estudio de anticuerpos unidos a las plaquetas (IgG asociada a plaquetas, PAIgG), anticuerpos libres en el suero y especificidad antigénica de los anticuerpos, no han mostrado ser de utilidad en la evaluación inicial de los pacientes con sospecha de PTI.

Tratamiento. En pacientes con recuentos de plaquetas superiores a 50x103/µL, asintomáticos o con púrpura leve, no es necesario iniciar tratamiento específico y se debería mantenerlos solo en observación. Las opciones de tratamiento de primera línea incluyen corticosteroides, inmunoglobulina intravenosa e inmunoglobulina anti-D. Estos y otros tratamientos se mencionan brevemente:

- **Glucocorticoides.** El uso de corticosteroides constituye el tratamiento estándar inicial en los adultos portadores de PTI. El efecto de los corticosteroides se evidencia alrededor de los siete días y es máximo a las 2-3 semanas. A largo plazo, no más del 15% de los pacientes tratados con corticoides experimenta remisión permanente.

- **Inmunoglobulina G intravenosa (IgGIV).** En el PTI del adulto la IgGIV se utiliza fundamentalmente cuando se requiere aumentar transitoriamente el recuento de plaquetas, específicamente en aquellos pacientes con $<50x10^3$ plaquetas/µL y hemorragias con riesgo vital.

- **Inmunoglobulina anti-Rh(D).** La infusión de inmunoglobulina anti-Rh(D) (anti-D) en pacientes adultos no esplenectomizados portadores de PTI crónico, produce un aumento transitorio (2-3 semanas) del recuento de plaquetas; en individuos esplenectomizados la respuesta es menos consistente. El efecto adverso más importante es la hemólisis con prueba de Coombs directa positiva.

- **Esplenectomía.** La esplenectomía está indicada en aquellos casos que no responden a corticosteroides o requieren dosis muy altas para mantener la remisión. A largo plazo la mayoría de los pacientes esplenectomizados permanecerán en remisión, la mitad de ellos con recuentos de plaquetas $>100x10^3$/µL.

- **Otros tratamientos.** En pacientes que ya han sido esplenectomizados y refractarios al tratamiento con corticosteroides existen numerosas opciones terapéuticas: Inmunosupresores (azatioprina y ciclofosfamida), Danazol (andrógeno modificado; sustituto de los corticosteroides), Rituximab (anticuerpo monoclonal anti-CD20 de linfocitos B) y agonistas del receptor de trombopoyetina (estimulan megacariopoyesis).

a2) Trombocitopenias inmunes secundarias

La trombocitopenia inmune puede aparecer como complicación de varias enfermedades sistémicas, siendo habitualmente indistinguible del PTI crónico. La asociación con lupus eritematoso sistémico (LES) es muy frecuente, presentándose hasta en un tercio de los casos. El PTI crónico se puede asociar a anemia hemolítica autoinmune (síndrome de Evans) o combinarse con autoanticuerpos con especificidad para factores de la coagulación o neutrófilos. Otras enfermedades autoinmunes asociadas a PTI crónico son: enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, miastenia gravis, esclerodermia, enfermedad mixta del tejido conectivo, síndrome de Sjögren, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn y cirrosis biliar.

El PTI crónico también se ha asociado a enfermedades linfoproliferativas como linfoma de Hodgkin, linfomas no Hodgkin, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenström y leucemia linfática crónica.

Enfermedades infecciosas que se asocian a la aparición de PTI crónico incluyen: citomegalovirus, mononucleosis infecciosa, hepatitis B, mycoplasma pneumoniae, leptospirosis, tuberculosis y toxoplasmosis; en estas patologías infecciosas se producen fenómenos de reactividad cruzada entre anticuerpos contra los antígenos patógenos y glicoproteínas de superficie plaquetaria. En pacientes portadores de infección por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) hasta 40% de los casos puede desarrollar un cuadro de PTI crónico, que a veces es el signo de presentación de la infección. En su patogenia juegan un papel muy importante la presencia de complejos inmunes que contienen componentes de la membrana plaquetaria y anticuerpos IgG dirigidos contra una región específica de la GPIIb-IIIa.

Trombocitopenia inmune asociada al uso de fármacos

La trombocitopenia aguda grave se puede asociar al uso de fármacos, lo que es mediado por un mecanismo inmune. Esta condición generalmente se sospecha por una disminución aguda y grave del recuento de plaquetas (generalmente $<50x10^3/\mu L$), lo que se asocia a un mayor riesgo de hemorragias espontáneas. En la tabla 33-7 se nombran los fármacos con asociación a trombocitopenia y en las cuales se ha demostrado su efecto por pruebas *in vitro* o por reexposición a la droga.

Los criterios importantes que permiten determinar la existencia de una trombocitopenia inducida por fármacos incluyen: (a) terapia con el fármaco sospechoso precede a la trombocitopenia, (b) recuperación completa y mantenida de la trombocitopenia después de suspender el fármaco, (c) el fármaco es el único utilizado al inicio de la trombocitopenia, (d) se excluyen otras causas de trombocitopenia y (e) reexposición al fármaco sospechoso se asocia con recurrencia del cuadro. A estos criterios se puede agregar la demostración de un anticuerpo que reacciona contra las plaquetas en presencia de la droga (prue-

ba de laboratorio). El diagnóstico oportuno es fundamental para revertir un resultado clínico desfavorable; este se basa esencialmente en el hemograma y la realización de pruebas funcionales o inmunoquímicas específicas destinadas a demostrar la presencia de anticuerpos antiplaquetarios.

Patogenia. En la mayoría de los casos, los anticuerpos inducidos por drogas se unen a las plaquetas, específicamente a través de su región Fab y no en la forma de complejos inmunes. Las glicoproteínas de la membrana plaquetaria IIb-IIIa y Ib-IX constituyen los blancos antigénicos más frecuentes. Se ha propuesto que la respuesta inmune se iniciaría por unión de la droga a los componentes de la membrana, induciendo un cambio estructural o formando un complejo fármaco-proteína (neoantígeno). Otros fármacos (metildopa y sales de oro) inducen trombocitopenia por formación de autoanticuerpos verdaderos, que no requieren del compuesto para reaccionar con las plaquetas. Pocos fármacos (penicilina y otros), se unen a la membrana plaquetaria induciendo la formación de anticuerpos dependientes de hapteno.

Tabla 33-7. Fármacos involucrados en trombocitopenia inmune

Droga	Reexposición	Anticuerpo dependiente de fármaco *in vitro*
Acetaminofeno	+	+
Ácido valproico	+	
Aspirina	+	+
Carbamazepina		+
Cefalotina	+	+
Clorotiazida		+
Clortalidona		+
Difenilhidantoína		+
Digoxina	+	+
Furosemida		+
Heparina	+	+
Meticilina	+	+
Metildopa	+	+
Quinidina	+	+
Quinina	+	+
Ranitidina	+	+
Rifampicina	+	+
Sales de oro	+	+
Sulfonamidas	+	+
Vancomicina		+

Trombocitopenia inducida por heparina

En aproximadamente 5% de los pacientes tratados con heparina no fraccionada (HNF) se puede presentar trombocitopenia. Aunque en estricto sentido la Trombocitopenia inducida por heparina (TIH) es el resultado del uso de

un fármaco, su patogenia, cuadro clínico y frecuencia de presentación, hacen necesario considerarla en forma separada. Los pacientes que presentan una trombocitopenia marcada asociada al uso de HNF, se complican con trombosis venosa y/o arterial.

Patogenia. En la TIH se han descrito dos formas: (a) tipo I, por acción directa de la heparina sobre las plaquetas, que no está mediada inmunológicamente y que activa a las plaquetas, siendo la trombocitopenia habitualmente leve, con recuento de plaquetas cercanos a $100x10^3$/μL y (b) tipo II, o inmune, por acción de un autoanticuerpo antiplaquetario dependiente de heparina. La interacción no covalente entre la heparina y el factor plaquetario 4 (PF4), produce una respuesta inmunológica con la producción de autoanticuerpos. Los complejos inmunes formados entre el PF4, la heparina y el anticuerpo, son reconocidos por el receptor FcγRIIa de las plaquetas, lo que induce su activación, liberación del contenido de sus gránulos y produciéndose la consiguiente agregación plaquetaria. Simultáneamente, los heparinoides presentes sobre la superficie de las células endoteliales unen PF4 y se forma el complejo con el anticuerpo, lo que resulta en daño de la célula endotelial que se podría transformar así en una superficie protrombótica. Aunque el inicio de la trombocitopenia suele durar 5 y 14 días en pacientes que reciben HNF, la exposición previa puede potenciar la reacción autoinmune y acelerar la activación plaquetaria, con su consecuente consumo y aumento de riesgo de trombosis (figura 33-2).

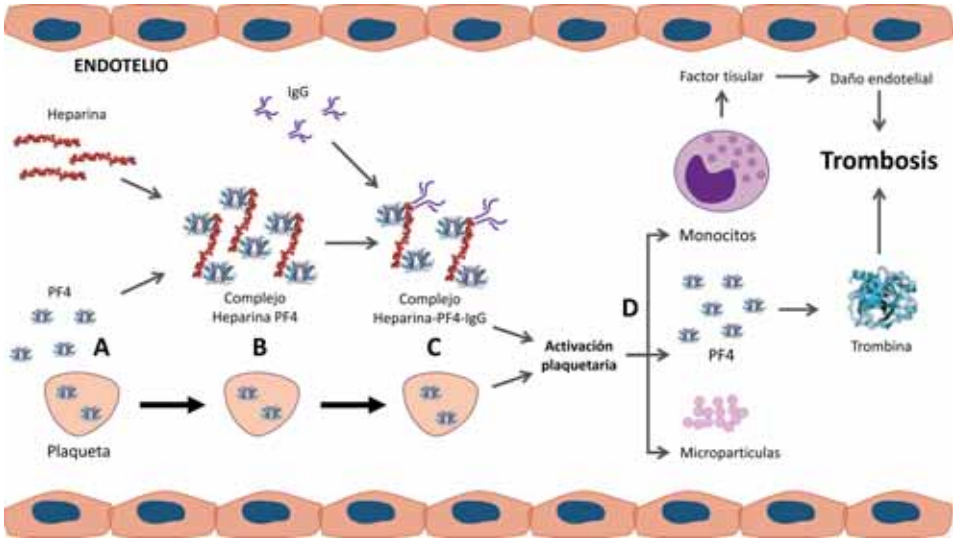


Figura 33-2. Fisiopatología de la trombocitopenia inducida por heparina. (A) En la membrana de las plaquetas y células endoteliales se encuentra el factor 4 plaquetario (PF4). (B) La heparina es capaz de unirse al PF4, formando el complejo heparina-PF4, el cual estimula la respuesta inmune y genera la producción de autoanticuerpos. (C) Los autoanticuerpos IgG se unen al complejo heparina-PF4. (D) Esta unión activa a las plaquetas, las cuales liberan micropartículas y secretan el contenido de sus gránulos que contienen PF4. El complejo heparina-PF4 también interactúa con los monocitos, que liberan factor tisular lo cual provoca daño endotelial, favoreciendo la trombosis. Tomado/adaptado de "Trombocitopenia inducida por heparina" Cruz-González, Revista Española de Cardiología, 2007.

Estudio de laboratorio. El anticuerpo dependiente de heparina se puede demostrar mediante técnicas inmunológicas (ELISA) o funcionales. El ensayo de ELISA más ampliamente utilizado se basa en la capacidad del anticuerpo de unirse al complejo PF4-heparina fijado a una fase sólida. Uno de los inconvenientes del diagnóstico es la presencia de "falsos positivos", ya que la mayoría de los anticuerpos identificados por las pruebas inmunológicas no activan las plaquetas en ensayos funcionales.

Tratamiento. En la mayoría de los pacientes que presentan una TIH la suspensión de la HNF es seguida por una rápida recuperación del recuento de plaquetas. En aquellos casos en que no se puede prescindir de tratamiento anticoagulante, se ha obtenido buenos resultados con la utilización de análogos de heparina sin reactividad cruzada con el anticuerpo (danaparoid). En estos casos también se ha usado inhibidores directos de trombina tales como lepirudina y argatroban.

b) Trombocitopenias aloinmunes

Las trombocitopenias aloinmunes resultan de la acción de aloanticuerpos que reconocen antígenos específicos sobre la membrana de las plaquetas, dando origen a dos entidades clínicas bien definidas: púrpura aloinmune neonatal (PAIN) y púrpura post-transfusional (PPT).

Aloantígenos plaquetarios. Los antígenos plaquetarios, de acuerdo con su origen y distribución, se pueden clasificar en dos grupos: (a) aloantígenos compartidos con otras células sanguíneas (ej., antígenos de los sistemas ABH, Lewis, P, I/i) y con células de otros tejidos (moléculas clase I del sistema HLA) y (b) los aloantígenos plaquetarios específicos. Estos últimos se generan por sustituciones aminoacídicas únicas de las glicoproteínas mayores de la membrana plaquetaria. Estas sustituciones son reconocidas por aloanticuerpos antiplaquetarios. En la tabla 33-8 se muestran los aloantígenos plaquetarios específicos, su localización, base molecular y frecuencia de expresión.

b1) Púrpura aloinmune neonatal

El Púrpura aloinmune neonatal (PAIN) es una rara, pero grave enfermedad que se presenta durante el embarazo. Su desarrollo se produce debido a aloinmunización materna y provoca trombocitopenia y riesgo de hemorragia en el feto y en el recién nacido. La presentación clínica puede variar desde una trombocitopenia asintomática hasta hemorragia cutánea o hemorragia grave de órganos. El PAIN se presenta típicamente como una trombocitopenia aislada en un recién nacido (RN) aparentemente sano. En aquellos RN con trombocitopenia más grave se puede encontrar sangrado cutáneo (petequias y equimosis) y sangrado mucoso que se manifiesta en las primeras horas de vida. En la mayoría de los casos, el PAIN es una enfermedad benigna autolimitada, que remite espontáneamente entre 2 y 15 días, sin embargo, en casos graves puede observarse hemorragia visceral e intracraneana.

Tabla 33-8. Características de los aloantígenos plaquetarios específicos

Sistema	Alelos	Sinónimos	Localización	Base molecular	Frecuencia fenotípica (%)
HPA-1	HPA-1a HPA-1b	Pl^{A1}, Zw^a Pl^{A2}, Zw^b	GPIIIa	Leu_{33}→Pro_{33}	97.9 28.8
HPA-2	HPA-2a HPA-2b	Ko^b, Sib^b Ko^a, Sib^a	GPIb	$Thre_{145}$→Met_{145}	99.3 14.6
HPA-3	HPA-3a HPA-3b	Lek^a, Bak^a Lek^b, Bak^b	GPIIb	Ile_{843}→Ser_{843}	80.9 69.8
HPA-4	HPA-4a HPA-4b	Pen^a, Yuk^b Pen^b, Yuk^a	GPIIIa	Arg_{143}→Glu_{143}	>99.9 <0.1
HPA-5	HPA-5a HPA-5b	Br^b Br^a	GPIa	Gln_{505}→Lys_{505}	99.0 19.7
HPA-6w	HPA-6bw	Ca^a, Tu^a	GPIIIa	Arg_{489}→Glu_{489}	2.4
HPA-7w	HPA-7bw	Mo	GPIIIa	Pro_{407}→Ala_{407}	0.2
HPA-8w	HPA-8bw	Sr^a	GPIIIa	Arg_{636}→Glu_{636}	<0.01
HPA-9w	HPA-9bw	Max^a	GPIIb	Val_{837}→Met_{837}	0.6
HPA-10	HPA-10bw	La^a Gro^a Iy^a Sit^a	GPIIIa GPIIIa GIb GPIa	Arg_{62}→Glu_{62} Arg_{633}→His_{633} Gly_{15}→Gln_{15} $Thre_{799}$→Met_{799}	<1.6 <0.25 0.4 0.25

Durante el embarazo, la exposición incompatible de antígenos plaquetarios humanos (HPA) de un feto en la circulación materna puede inducir inmunización y formación de aloanticuerpos en la madre. La IgG (aloanticuerpos) es transportada de la madre a la circulación fetal a través de la placenta. Así, los aloanticuerpos IgG anti-HPA se unen a las plaquetas fetales, lo que provoca la fagocitosis de estas, causando trombocitopenia y riesgo de hemorragia en estos lactantes. La trombocitopenia en PAIN no solo es el resultado de la destrucción de plaquetas, sino que también puede empeorar debido a la supresión de la megacariopoyesis. Sobre el 50% de los casos de PAIN resulta de una incompatibilidad dentro del sistema HPA-1 (padre HPA-1a, madre HPA-1b, feto $HPA\text{-}1^a$).

Utilizando técnicas serológicas se puede detectar en el suero materno anticuerpos que reaccionan con las plaquetas paternas. La tipificación antigénica de las plaquetas maternas y paternas es también útil en el estudio del PAIN,

especialmente en aquellos casos en que no se encuentran anticuerpos en el suero de la madre.

En la mayoría de los casos, el PAIN es clínicamente leve y no se necesita un tratamiento específico. La recuperación del recuento de plaquetas ocurre en 1 a 2 semanas, aunque excepcionalmente esta puede durar meses. La transfusión de plaquetas es el tratamiento de elección en los casos sintomáticos graves. Se debe transfundir plaquetas compatibles con el aloanticuerpo materno, siendo la mejor alternativa utilizar plaquetas de la madre, lavadas para eliminar el plasma que contiene el anticuerpo e irradiadas para evitar la enfermedad injerto versus huésped transfusional. El uso de IgGIV produce un acortamiento del período de trombocitopenia.

b2) Púrpura post-transfusional

El púrpura postransfusional (PPT) es una complicación poco común, pero grave de trombocitopenia, que se desarrolla dentro de las dos semanas posteriores a la transfusión. La probabilidad de desarrollo de PPT parece aumentar por la exposición previa a HPA ausente en las plaquetas del paciente. En el 90% de los casos se trata de mujeres multíparas que reciben su primera transfusión. Fisiopatológicamente, los pacientes previamente sensibilizados a los HPA durante el embarazo o la transfusión, se vuelven a sensibilizar al mismo o los mismos antígenos y producen potentes anticuerpos que reaccionan frente a las plaquetas. Los anticuerpos contra HPA-1a son los reportados con mayor frecuencia.

Existen tres teorías para explicar cómo los anticuerpos ant-HPA-1a pueden participar también en la eliminación, tanto de las plaquetas HP-1a+ transfundidas como las plaquetas autólogas del paciente, que no expresan HPA-1^{a}: (a) Los complejos inmunes compuestos de anti-HPA-1a y HPA-1a soluble transfundido se unen de manera no específica a plaquetas autólogas, lo que conduce a la eliminación de plaquetas a través de macrófagos en el sistema fagocítico mononuclear, (b) El HPA-1a soluble transfundido recubre las plaquetas del paciente a las que luego se unen los anticuerpos anti-HPA-1a presentes en el plasma del enfermo y posteriormente el retiro ocurre como se indicó antes, y (c) Los autoanticuerpos plaquetarios se producen concomitantemente con aloanticuerpos HPA-1^{a}; los autoanticuerpos, no los anticuerpos HPA-1a, causan destrucción plaquetaria autóloga (teoría más aceptada).

El diagnóstico se basa en la demostración del aloanticuerpo antiplaquetario en pacientes con cuadro clínico compatible. En la mayoría de los casos la evolución del PPT es hacia la remisión espontánea en el curso de 1 a 6 semanas. En pacientes con trombocitopenia grave y hemorragias con riesgo vital, el uso de plasmaféresis se acompaña de rápida recuperación del recuento de plaquetas y regresión de la sintomatología. También se han obtenido buenos resultados con el uso de IgGIV. La transfusión de plaquetas es habitualmente de muy limitada efectividad.

3.2.2. Trombocitopenias no inmunes

a) Púrpura trombótico trombocitopénico y Síndrome hemolítico urémico

El púrpura trombótico trombocitopénico (PTT) y el síndrome hemolítico urémico (SHU) son dos enfermedades multisistémicas que se caracterizan por la existencia común de trombocitopenia y anemia hemolítica microangiopática, secundarias a trombosis de la microvasculatura arterial. Clínicamente, la diferenciación entre estos dos síndromes se sustenta en el mayor compromiso neurológico en el PTT y predominio de la disfunción renal en el SHU.

El **PTT** es una enfermedad más frecuente en adultos, de comienzo brusco y la presencia de trombocitopenia, anemia hemolítica microangiopática, fiebre, compromiso neurológico e insuficiencia renal. Ya que es necesario iniciar precozmente el tratamiento, los criterios de diagnóstico se han reducido a anemia hemolítica microangiopática asociada a trombocitopenia, no explicada por otras causas.

El **SHU** es clásicamente una enfermedad renal caracterizada por una microangiopatía renal trombótica, trombocitopenia y anemia hemolítica microangiopática. La bacteria Escherichia coli 0157:H7 es un agente etiológico importante en el SHU en niños y ocasionalmente en los adultos. Los niños que presentan un SHU asociado a diarrea epidémica generalmente no requieren de plasmaféresis y evolucionan hacia la recuperación espontánea.

Patogenia. En el PTT la deficiencia grave de ADAMTS13 es el resultado de mutaciones compuestas heterocigotas u homocigotas en ADAMTS13 (figura 33-3). Se han identificado más de 100 mutaciones de ADAMTS13, incluidas mutaciones con cambio de sentido (la mayoría, alrededor de 60%), sin sentido y deleciones e inserciones. Como es típico de los trastornos autosómicos recesivos, los individuos portadores de mutaciones ADAMTS13 homocigotas se encuentran principalmente en familias con consanguinidad parental documentada. Teniendo en consideración que la enzima ADAMTS13 corta los multímeros de FVW, su disminución o disfunción genera multímeros de gran tamaño molecular, los que en circulación favorecen la agregación y activación plaquetaria, formando microtrombos ricos en FvW que son un sello distintivo de la PTT. Estos microtrombos diseminados generan: (a) consumo de plaquetas, lo que causa trombocitopenia, (b) destruyen mecánicamente los glóbulos rojos, lo que conduce a una anemia hemolítica microangiopática con presencia de esquistocitos, y (c) ocluyen la microcirculación y causan isquemia de órganos. Los trombos microvasculares están presentes en casi todos los órganos, particularmente en el cerebro (principalmente en la corteza cerebral), corazón, riñones y tracto digestivo, pero también en el bazo, páncreas y glándulas suprarrenales. En ausencia de un tratamiento adecuado, los pacientes desarrollan insuficiencia orgánica múltiple. Existe una variable de PTT inmune, la cual se caracteriza por la aparición de autoanticuerpos anti-ADAMTS13; en este caso la deficiencia de la proteasa está asociada a la aparición de estos au-

toanticuerpos específicos. Se ha descrito deficiencia de la proteasa ADAMTS13 en otras condiciones clínicas diferentes de PTT, tales como uremia, insuficiencia hepática, LES y post-operatorio.

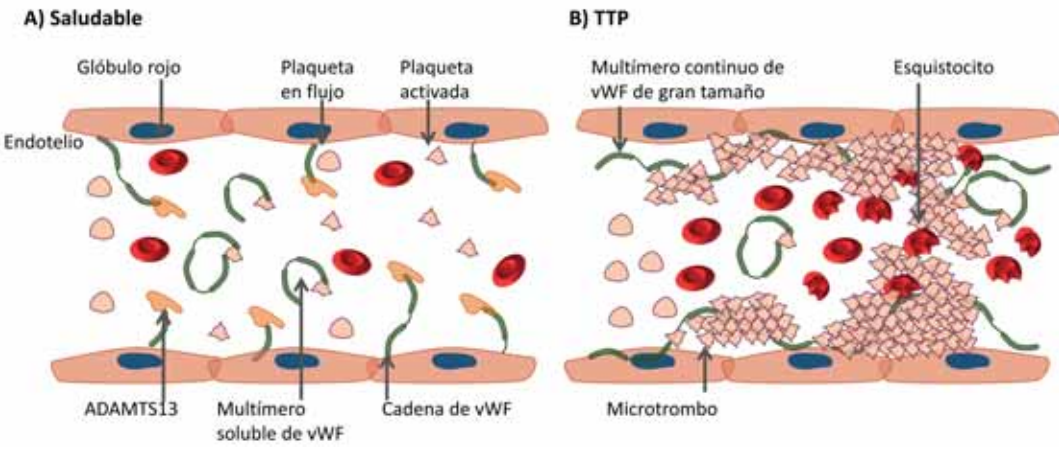


Figura 33-3 Fisiopatología del Púrpura trombótico trombocitopénico (PTT). (A) Microvaso sanguíneo de un individuo sano. La desintegrina y metaloproteinasa (ADAMTS13) escinde las cadenas multiméricas de factor de von Willebrand (vWF) de gran tamaño, que están ancladas o secretadas por células endoteliales. Este proceso previene y regula la adherencia de las plaquetas (a través de la glicoproteína Ib). (B) Microvaso de un individuo con PTT. Cuando la actividad de ADAMTS13 es <10 % del nivel normal, la escisión de las cadenas de vWF de gran tamaño se reduce considerablemente. Esto provoca la adhesión excesiva de plaquetas al endotelio, generando microtrombos que ocluyen casi totalmente la microcirculación. Los glóbulos rojos sufren lesión por cizallamiento produciendo esquistocitos y hemólisis, lo cual activa la vía alternativa del complemento en las cadenas de vWF de gran tamaño no escindidas. Tomado/adaptado de "Thrombotic thrombocytopenic purpura" Kremer Hovinga, Nature reviews. Disease primers, 2017.

El SHU, es un diagnóstico diferencial de la PTT y es causado por bacterias enterohemorrágicas productoras de toxina Shiga (STX), principalmente Escherichia coli. El SHU se presenta principalmente en niños menores de 5 años y rara vez se observa en adultos. Después de una fase prodrómica de la diarrea, los pacientes presentan una tríada clínica: trombocitopenia, anemia hemolítica microangiopática e insuficiencia renal. Estos pacientes tienen una actividad de ADAMTS13 generalmente normal o solo levemente reducida. En estos pacientes se identifica principalmente Escherichia coli O157:H7 y otros serotipos. La patogenia del SHU corresponde a una microangiopatía trombótica. En el SHU, el compromiso orgánico predomina en el riñón y se caracteriza por una activación anómala del complemento, que provoca lesión endotelial con activación de la hemostasia primaria y secundaria.

Tratamiento. La plasmaféresis es tratamiento más importante de PTT/SHU. Se realiza una plasmaféresis diariamente, removiendo al menos un volumen plasmático, el que se reemplaza con plasma fresco congelado o sobrenadante de crioprecipitado. El beneficio teórico del uso de sobrenadante de criopre-

cipitado se basa en su menor contenido de FvW. Este tratamiento repone la actividad de ADAMTS13 y elimina autoanticuerpos anti-ADAMTS13, complejos inmunes ADAMTS13, multímeros de FvW de alto peso molecular y citoquinas inflamatorias. Eventualmente la adición de glucocorticoides es necesaria. Para el caso de PTT inmune, se puede emplear rituximab o inmunomoduladores con el objetivo de suprimir la producción de autoanticuerpos anti-ADAMTS13.

b) Trombocitopenia gestacional

La trombocitopenia gestacional se desarrolla en el 5-10% de las mujeres durante el embarazo o en el período posparto inmediato. Su diagnóstico se basa en un recuento de plaquetas por debajo de $150x10^3$/µL después del segundo trimestre del embarazo, en ausencia de otras alteraciones hematológicas o clínicas. Generalmente se detecta en el tercer trimestre o inmediatamente antes del parto. Es responsable de alrededor de 75% de los casos de trombocitopenia que ocurren durante el embarazo. La causa de esta trombocitopenia es desconocida, pero se ha sugerido que podría corresponder a una exacerbación de un proceso fisiológico de remoción de plaquetas durante el embarazo, donde se genera un secuestro de plaquetas en la placenta y el bazo.

c) Preeclampsia/eclampsia

La trombocitopenia ocurre en tasas de 15-20% en casos de preeclampsia y sobre 40% en pacientes con eclampsia. En la gran mayoría de los casos esta es leve o moderada. Un subgrupo de pacientes puede presentar hemólisis microangiopática, elevación de las enzimas hepáticas y trombocitopenia (síndrome de HELLP), cuadro que representa una forma grave de preeclampsia. La patogenia de la trombocitopenia en la preeclampsia no es clara; algunos señalan que existe un estado protrombótico en la preeclampsia/eclampsia producto de la hipertensión, inflamación y aumento de activación plaquetaria e hipercoagulabilidad. Las plaquetas activadas se acumulan particularmente dentro del lecho vascular placentario, ya que en algunos pacientes se demuestra aumento en la generación de trombina, lo que podría contribuir a la trombocitopenia por activación y consumo.

d) Trombocitopenia asociada a infección

Los agentes infecciosos pueden participar en la génesis de trombocitopenia por el aumento del consumo periférico o por supresión de la médula ósea. Se ha descrito una mayor participación de infecciones virales y bacterianas.

Los virus pueden desencadenar una disminución de la producción de plaquetas al infectar directamente a los megacariocitos o células madre hematopoyéticas de la médula ósea. También pueden interactuar directamente con las plaquetas, pero las plaquetas también pueden reconocer inmunocomplejos de partículas virales e inmunoglobulinas a través de su receptor FcγRII, lo que desencadena la activación y agregación plaquetaria. Además, se pueden producir fenómenos

de reactividad cruzada entre anticuerpos contra glicoproteínas virales y glicoproteínas de superficie plaquetaria como GPIIb-IIIa o GPIb-IX que estimulan activación plaquetaria. Finalmente, los virus pueden interferir con la producción de trombopoyetina dañando el tejido hepático (VHC), provocando un retraso en la megacariopoyesis. Cualquiera que sea el mecanismo subyacente, el resultado es una mayor remoción de las plaquetas recubiertas de IgG por los macrófagos que expresan FcγR, tanto en el hígado como en el bazo. En pacientes con infección por VIH/SIDA, la trombocitopenia resulta de una combinación de destrucción inmunológica y compromiso de la médula ósea.

La infección crónica por Helicobacter pylori se asocia a trombocitopenia. El mecanismo más aceptado es el mimetismo molecular, donde los anticuerpos producidos contra el antígeno del gen A asociado a citotoxina (CagA) de Helicobacter pylori reaccionan de forma cruzada con glicoproteínas plaquetarias, produciendo una remoción acelerada de plaquetas.

La recuperación del recuento de plaquetas es habitualmente paralela a la resolución del cuadro infeccioso. Las transfusiones de plaquetas no son necesarias a menos que el recuento de plaquetas sea menor de $^{20x10^3}$/µL o existan condiciones asociadas que puedan determinar un sangrado grave.

e) Trombocitopenia asociada a exposición a superficies no biológicas

La introducción de superficies extrañas en la circulación se asocia a consumo selectivo de plaquetas. En el caso de cirugía con circulación extracorpórea (CEC), existe un amplio espectro de alteraciones hemostáticas, entre las cuales destaca la trombocitopenia y la disfunción plaquetaria transitoria. En la CEC, el recuento de plaquetas habitualmente disminuye en un 30-50% debido fundamentalmente a hemodilución, secuestro, destrucción en el oxigenador. Aun cuando en pacientes portadores de válvulas cardíacas protésicas existe un acortamiento de la supervivencia de las plaquetas, la trombocitopenia es muy infrecuente y cuando esta ocurre, es leve. La inserción de catéteres, especialmente en pacientes pediátricos se ha asociado infrecuentemente a trombocitopenia por aumento del consumo de plaquetas.

3.3. Trombocitopenia por secuestro esplénico

La esplenomegalia de cualquier etiología se puede acompañar de trombocitopenia de grado variable, aunque la hemorragia espontánea en esta situación es una complicación extraordinariamente infrecuente. Es frecuente la asociación con neutropenia y anemia leve. En sujetos normales, alrededor del 30% de la masa de plaquetas se encuentra en el bazo; en pacientes con esplenomegalia el secuestro esplénico puede ser mayor al 80% de las plaquetas, lo que determina una disminución del número de plaquetas circulantes. La esplenectomía estaría indicada solo en aquellos casos en que la magnitud del secuestro se traduzca en citopenias sintomáticas (ej. hemorragias o infecciones).

3.4. Trombocitopenia dilucional

En pacientes que reciben transfusión masiva de sangre, se observa frecuentemente trombocitopenia como resultado del efecto directo de la hemodilución; la disminución del recuento de plaquetas en estos casos muy rara vez alcanza niveles inferiores a 50x103 plaquetas/µL. Por otra parte, durante la transfusión masiva de sangre se ha descrito también la existencia de disfunción plaquetaria y alteraciones de la hemostasia secundaria, propios de la terapia de reemplazo. La trombocitopenia puede además agravarse por aumento del consumo de plaquetas si el paciente desarrolla una Coagulación Intravascular Diseminada (CID). La transfusión de plaquetas estaría indicada solo si la trombocitopenia está contribuyendo en forma significativa al defecto hemostático.

4. LECTURAS SUGERIDAS

Trombocitopenias Hereditarias

Balduini, C.L., Iolascon, A., Savoia, A. “Inherited thrombocytopenias: from genes to therapy”. Haematologica; 87: 860-880, 2002.

Bussel, J.B. “Congenital hereditary familial thrombocytopenias” In: Hematology, Broudy, V.C., Berliner, N., Larson, R.A., Leung, L.L. (eds.) American Society of Hematology, Washington DC. 2004, pp. 390-397.

Trombocitopenias Adquiridas

Danese E, Montagnana M, Favaloro EJ, Lippi G. Drug-Induced Thrombocytopenia: Mechanisms and Laboratory Diagnostics. Seminars in thrombosis and hemostasis. 2020;46(3):264-74.

Hurwitz A, Massone R, Lopez BL. Acquired Bleeding Disorders. Hematology/oncology clinics of North America. 2017;31(6):1123-45.

Bredlau AL, Semple JW, Segel GB. Management of immune thrombocytopenic purpura in children: potential role of novel agents. Paediatric drugs. 2011;13(4):213-23.

Singh G, Bansal D, Wright NAM. Immune Thrombocytopenia in Children: Consensus and Controversies. Indian journal of pediatrics. 2020;87(2):150-7.

Blanchette V, Bolton-Maggs P. Childhood immune thrombocytopenic purpura: diagnosis and management. Hematology/oncology clinics of North America. 2010;24(1):249-73.

Kohli R, Chaturvedi S. Epidemiology and Clinical Manifestations of Immune Thrombocytopenia. Hamostaseologie. 2019;39(3):238-49.

Despotovic JM, Grimes AB. Pediatric ITP: is it different from adult ITP? Hematology American Society of Hematology Education Program. 2018;2018(1):405-11.

de Vos TW, Winkelhorst D, de Haas M, Lopriore E, Oepkes D. Epidemiology and management of fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis. 2020;59(1):102704.

Hawkins J, Aster RH, Curtis BR. Post-Transfusion Purpura: Current Perspectives. Journal of blood medicine. 2019;10:405-15.

Kremer Hovinga JA, Coppo P, Lammle B, Moake JL, Miyata T, Vanhoorelbeke K. Thrombotic thrombocytopenic purpura. Nature reviews Disease primers. 2017;3:17020.

Stanley M, Killeen RB, Michalski JM. Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. StatPearls. Treasure Island (FL)2021.

Sadler JE. Pathophysiology of thrombotic thrombocytopenic purpura. Blood. 2017;130(10):1181-8.

Cines DB, Levine LD. Thrombocytopenia in pregnancy. Blood. 2017;130(21):2271-7.

Pishko AM, Levine LD, Cines DB. Thrombocytopenia in pregnancy: Diagnosis and approach to management. Blood reviews. 2020;40:100638.

Jakobsen C, Larsen JB, Fuglsang J, Hvas AM. Platelet function in preeclampsia - a systematic review and meta-analysis. Platelets. 2019;30(5):549-62.

Franchini M, Veneri D, Lippi G. Thrombocytopenia and infections. Expert review of hematology. 2017;10(1):99-106.

Capítulo

34

TROMBOCITOPATÍAS

Iván Palomo G. y Eduardo Fuentes Q.

Resumen

1. Introducción

2. Trombocitopatías hereditarias
2.1. Defectos hereditarios de la adhesión plaquetaria
2.1.1. Patología del complejo glicoproteico Ib-IX-V
a) Síndrome de Bernard-Soulier
b) Síndrome de seudo-von Willebrand
2.1.2. Patología de los receptores plaquetarios del colágeno: complejo glicoproteico Ia-IIa, GPVI, GPIV
a) Patología del complejo GPIa-IIa
b) Patología de la GPVI
c) Patología de la GPIV
2.1.3. Defectos hereditarios de la agregación plaquetaria: Tromboastenia de Glanzmann

2.1.4. Defectos congénitos de la secreción plaquetaria
   a) Síndrome de las plaquetas grises
   b) Deficiencia en el almacenamiento de gránulos δ
   c) Deficiencia combinada de gránulos α y δ
   d) Alteración plaquetaria tipo Quebec
2.1.5. Defectos hereditarios en los mecanismos implicados en la transmisión de señales de activación plaquetaria
   a) Defectos en los receptores para agonistas
   b) Defectos en otros elementos intraplaquetarios implicados en la activación: proteínas G, enzimas efectoras, segundos mensajeros, fosforilación de proteínas
   c) Defectos en el metabolismo del ácido araquidónico y/o en la producción de tromboxano A2
2.1.6. Alteraciones congénitas de la actividad procoagulante de las plaquetas
2.1.7. Otras trombocitopatías

3. Trombocitopatías adquiridas

3.1. Asociadas a enfermedades sistémicas
   3.1.1. Trombocitopatía urémica
   3.1.2. Anomalía funcional de las plaquetas en insuficiencia hepática
   3.1.3. Alteraciones plaquetarias inducidas por la cirugía con circulación extracorpórea
   3.1.4. Disfunción plaquetaria en leucemias, mielodisplasias y disproteinemias
3.2. Disfunciones plaquetarias inducidas por drogas y alimentos
   a) Aspirina y antiinflamatorios no esteroideos
   b) Antibióticos β-lactámicos
   c) Heparina y fibrinolíticos
   d) Drogas que aumentan la concentración de cAMP y cGMP en plaquetas
   e) Expansores de volumen
   f) Otras sustancias y fármacos

4. Métodos de estudios plaquetarios

a) Medición de TXA2
b) Medición de ATP/ADP
c) Agregación plaquetaria
d) Tiempo de oclusión
e) Citometría de flujo

5. Lecturas sugeridas

RESUMEN

Las trombocitopatías, tanto hereditarias como adquiridas, son alteraciones funcionales de las plaquetas a nivel de adhesión, agregación, secreción, receptores y transducción de señales, y que resultan en un tiempo de sangrado prolongado, formación defectuosa de coágulos y tendencia a la hemorragia. Los síntomas hemorrágicos típicos de las trombocitopatías son equimosis, hemorragia mucocutánea, epistaxis, menorragia y hemorragia perioperatoria. Las trombocitopatías hereditarias son mucho menos frecuentes en comparación con las alteraciones adquiridas de las plaquetas. Sin embargo, los trastornos hereditarios pueden provocar una tendencia al sangrado de leve a moderado. Las disfunciones más graves, que tradicionalmente sirven de modelos para la enseñanza de la fisiología y fisiopatología plaquetaria, como el Síndrome de Bernard-Soulier y la Enfermedad de Glanzmann son de ocurrencia excepcional. Mientras que la trombocitopatía adquirida es frecuente, y está relacionada con la ingestión de fármacos como aspirina y antiinflamatorios no esteroidales, además de algunos alimentos. La realización de pruebas de función plaquetaria es esencial para el diagnóstico en pacientes con síntomas de sangrado clínicamente relevantes. Así, se debe hacer todo lo posible para clarificar el defecto específico de la función plaquetaria (por ejemplo: agregación) para garantizar un tratamiento preciso y apropiado a los pacientes. En este contexto, la agregometría de transmisión de luz se considera el método estándar para la evaluación inicial de la función plaquetaria.

1. INTRODUCCIÓN

Las alteraciones con implicancia clínica de la función plaquetaria (Trombocitopatías) se pueden originar por defectos de tipo hereditario o presentarse en forma adquirida. Este capítulo contiene una descripción general de las principales trombocitopatías hereditarias y adquiridas de las plaquetas, con un análisis de la fisiopatología, clínica de los defectos más relevantes y algunos aspectos sobre el apoyo diagnóstico de pruebas de laboratorio.

2. TROMBOCITOPATÍAS HEREDITARIAS

Las plaquetas tienen su origen en la fragmentación citoplasmática del megacariocito y su ultraestructura plaquetaria está subdividida en membrana plaquetaria, gránulos y organelos intracitoplasmáticos, y citoesqueleto (Figura 34-1). Las plaquetas desempeñan un papel principal en la hemostasia, y también en la trombosis. En situaciones fisiológicas, las plaquetas circulan libremente en la sangre sin adherirse a las células endoteliales, pero en respuesta al daño vascular, las plaquetas se adhieren fácilmente al subendotelio expuesto en las zonas de lesión vascular, para luego iniciar los procesos de activación, agregación y secreción. Las plaquetas adheridas/agregadas favorecen la activación local de la

coagulación, desencadenando la formación de un trombo de células sanguíneas y fibrina que sella el vaso de forma estable. En condiciones patológicas, un exceso de adhesividad y agregación plaquetaria puede favorecer el desarrollo de trombosis. Por el contrario, las alteraciones que afectan la función plaquetaria pueden traducirse en hemorragias, las cuales pueden ser de gran severidad y comprometer la vida de los individuos afectados.

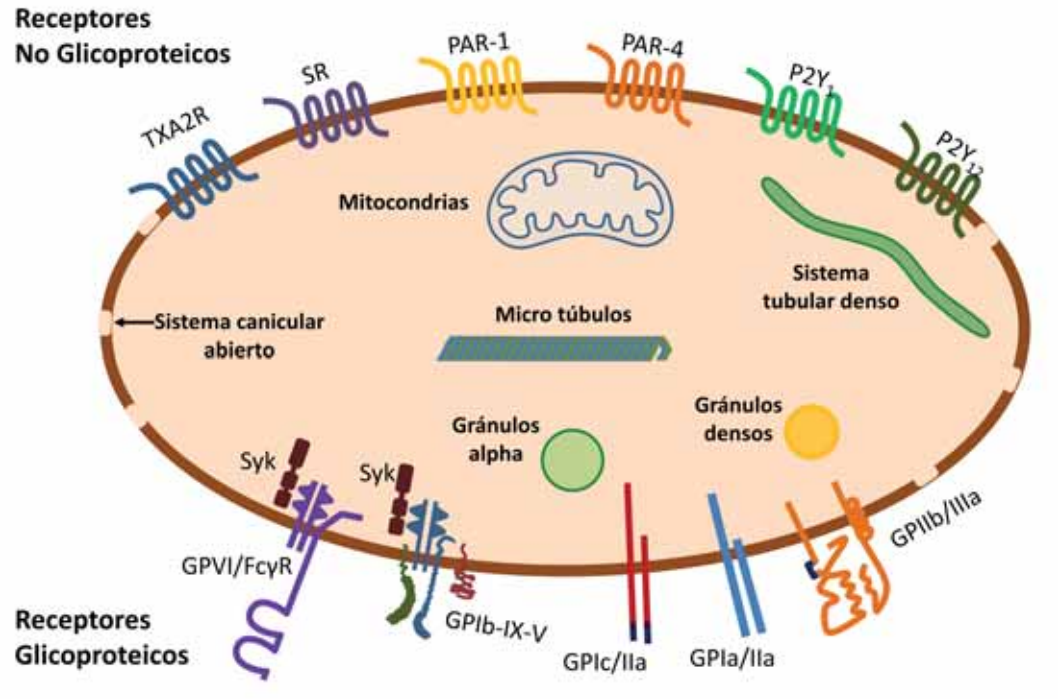


Figura 34-1. Ultraestructura plaquetaria. Se muestran los receptores glicoproteicos y no glicoproteicos y algunas estructuras intraplaquetarias. TXA2R, Receptor de Tromboxano A2; Sr. Receptor de Serotonina (5-Hidroxitriptamina); PAR-1 y PAR-4, Receptores de Trombina; P2Y1 y P2Y12, Receptores de ADP.

A continuación, se revisarán las principales disfunciones plaquetarias hereditarias, sus bases moleculares y aspectos clínicos. Aunque cualquier alteración de las plaquetas puede comprometer la globalidad de su función, por razones expositivas estas han sido ordenadas según la función principalmente afectada por el defecto hereditario: defectos de adhesión, de agregación, de secreción, de transmisión de señales de activación, de la actividad procoagulante, y otros defectos (tabla 34-1).

Tabla 34-1. Clasificación de las Trombocitopatías hereditarias

Alteraciones en la capacidad de adhesión
- Síndrome de Bernard-Soulier (SBS): Defecto en GPIb-IX-V
- Enfermedad de seudo von Willebrand: Defecto en GPIb-IX-V
- Deficiencia en la interacción con colágeno: Defecto en GPIa-IIa o GPVI

Defectos de la agregación plaquetaria
- Tromboastenia de Glanzmann: Defecto en GPIIb-IIIa

Deficiencias de los gránulos plaquetarios y/o secreción
- Deficiencia de los gránulos ("pool" de almacenamiento):
  - α: Síndrome de plaqueta gris
  - δ
  - α y δ
  - Síndrome de Quebec

Alteraciones en la transmisión de señales de activación
- Deficiencias de receptores de agonistas
- Defectos en proteínas G
- Defectos en enzimas efectoras (fosfolipasas, nucleótido ciclasas)
- Defectos de la movilización de segundos mensajeros (IP_3, calcio, etc.)
- Defectos específicos en la vía metabólica del ácido araquidónico

Defectos de la actividad procoagulante de las plaquetas
- Síndrome de Scott; Síndrome de Stormorken; SBS

Otros defectos
- Síndrome de Wiskott-Aldrich
- Síndrome de Down, macrotrombocitopenias constitucionales

2.1. Defectos hereditarios de la adhesión plaquetaria

La adhesión plaquetaria, primer eslabón en la cadena de la respuesta hemostática, depende principalmente de la interacción del receptor plaquetario Ib-IX-V con el factor von Willebrand (FVW) del subendotelio, y a ella contribuye también la adhesión al colágeno mediada por la glicoproteína (GP) Ia-IIa y/o otros receptores del colágeno. Defectos en alguno de estos receptores, principalmente del complejo Ib-IX-V, se traducen en alteración de la adhesión plaquetaria. Para la enfermedad del FVW ver capítulo 35.

2.1.1. Patología del complejo glicoproteico Ib-IX-V

El receptor Ib-IX-V es un macrocomplejo formado por las GPs Ibα (143 kDa), Ibβ (22 kDa), IX (20 kDa), y V (83 kDa), asociadas en relación estequiométrica

2 Ibα: 2 Ibβ: 2 IX: 1 V. Estas GPs pertenecen a la familia de proteínas con dominios ricos en leucina, y son fruto de la expresión de genes localizados en los cromosomas 17p12 (GPIbα), 22q11.2 (GPIbβ), 3q29 (GPV), y 3q21 (GPIX). La expresión del receptor en la membrana plaquetaria, de unas 25.000 copias por plaqueta, está sujeta a un estricto control fisiológico. Así, la expresión de Ibα, Ibβ, y IX es conjunta, mientras que la GPV puede expresarse individualmente, pero en menor proporción que cuando están presentes el resto de las cadenas. Una descripción detallada de las características estructurales y funcionales de este complejo está fuera del objetivo de este capítulo.

El complejo Ib-IX-V cumple dos funciones esenciales para la adecuada participación de las plaquetas en la hemostasia. La primera es facilitar la adhesión inicial de las plaquetas a las zonas de lesión vascular actuando como el receptor principal del FVW unido al colágeno expuesto en el subendotelio. La segunda es actuar como receptor de alta afinidad para la trombina, potente agonista plaquetario, facilitando la activación local de las plaquetas ante bajas concentraciones de este agonista. La importancia de estas funciones se refleja claramente en los dos tipos de trastornos hemorrágicos asociados a deficiencias hereditarias de este complejo, el síndrome de Bernard-Soulier (SBS), y la enfermedad de seudo-von Willebrand.

a) Síndrome de Bernard-Soulier

El Síndrome de Bernard-Soulier (SBS), identificado por primera vez por Bernard y Soulier en 1948, quienes describieron el primer paciente que presentó repetidos episodios de sangrado a lo largo de su vida y que murió a los 28 años de edad, como producto de una hemorragia intracraneal provocada luego de un accidente. Este síndrome es una diátesis hemorrágica congénita caracterizada por la presencia de trombocitopenia, macroplaquetas, tiempo de sangría prolongado, y retracción del coágulo normal.

Patogenia. La mayor alteración funcional de las plaquetas SBS es su nula o escasa capacidad de adhesión al subendotelio vascular, por la ausencia o disfunción del complejo Ib-IX-V. La deficiencia de este receptor condiciona otras características fenotípicas de las plaquetas SBS: su incapacidad para aglutinar normalmente en presencia de FVW normal e inductores como la ristocetina o la botrocetina, lo cual no es corregido al agregar plasma normal o FVW, y una reactividad disminuida frente a bajas dosis de trombina, que es indicativa del papel que juega el complejo Ib-IX-V como receptor plaquetario para este agonista. Además, sí existe agregación con ADP y colágeno. Por otra parte, la actividad coagulante de las plaquetas SBS puede ser normal, pero también puede encontrarse aumentada o disminuida. Las alteraciones de la capacidad procoagulante pueden estar relacionadas con el hallazgo de una organización anormal de los fosfolípidos de la membrana de las plaquetas SBS.

La transmisión genética del SBS es habitualmente autosómica recesiva, y con frecuencia existe consanguinidad entre los individuos afectados. Considerando

el número de casos identificados en distintos países del mundo, se estima que la prevalencia del SBS es aproximadamente de 1 caso por cada millón de personas, afectando de igual manera a hombres y mujeres. Generalmente, solo los sujetos homocigotos manifiestan signos de la enfermedad, mientras que los heterocigotos son asintomáticos. De acuerdo a datos de la Federación Mundial de Hemofilia en 2019, a nivel mundial se reportaron menos de 700 casos.

Desde el punto de vista molecular, el SBS es una patología muy heterogénea, que puede ser causada por distintas deleciones, inserciones, y mutaciones puntuales en los genes que codifican las proteínas que integran el complejo. Hasta la fecha, todas las alteraciones moleculares en pacientes con SBS han sido localizadas en los genes de las GPIbα, Ibβ, y IX, y ninguna en la GPV. Curiosamente, casi la mitad de estas alteraciones genéticas afectan a las regiones ricas en leucina o las secuencias que las flanquean, enfatizando la importancia de estas regiones para la expresión y funcionalidad del receptor Ib-IX-V (Figura 34-2). La tabla 34-2 resume las principales alteraciones genéticas identificadas hasta ahora en sujetos con SBS. Existen bases de datos accesibles por Internet donde obtener información actualizada sobre las alteraciones moleculares en el SBS (http://www.bernard-soulier.org/). Es importante resaltar que la identificación de estas alteraciones moleculares, y su reproducción en modelos celulares experimentales contribuye enormemente a comprender mejor la fisiopatología del SBS, los mecanismos que regulan la biosíntesis y expresión del complejo Ib-IX-V, y la interrelación entre la estructura del complejo y su función.

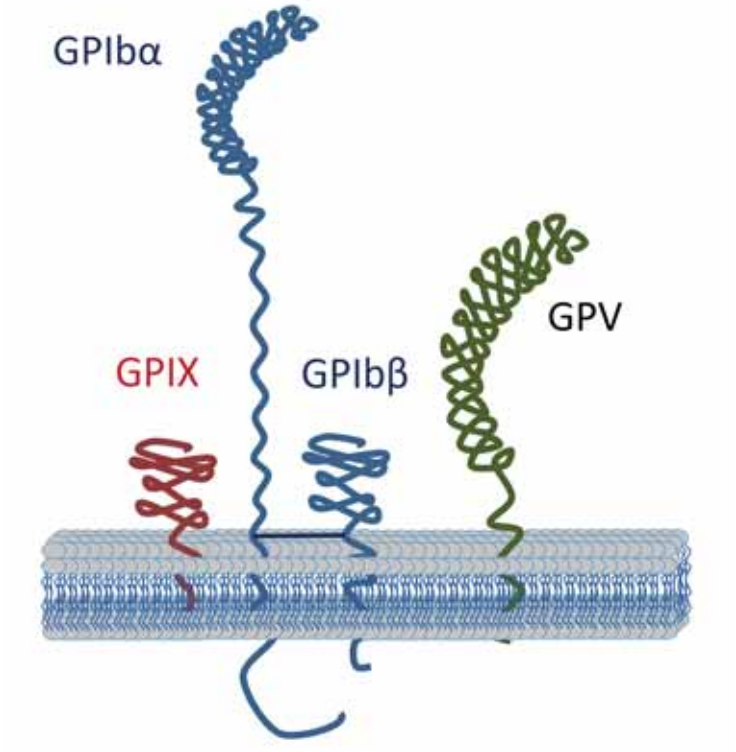


Figura 34-2. Complejo GPIb-IX-V.

Tabla 34-2. Algunas alteraciones moleculares identificadas en pacientes con Síndrome de Bernard-Soulier

	Genotipo	Mutación	Fenotipo	Alteración proteica
GPIbα	Homocigosis	103Adel	Deleción	Lys19→Arg codón 21→ codón stop
	Heterocigosis Transm. dominante	259C→T	Mutación puntual	Leu57→Phe GPIbα muy sensible a proteasas
	Doble heterocigosis	T283→C	Mutación puntual	Cys65→Arg Proteína que no liga FVW
	Homocigosis	T317→del	Deleción	Leu76→Arg Codón 125→stop
	Homocigosis Doble heterocigosis	476T→C	Mutación puntual	Leu129→Pro129 Unión deficiente de FVW
	Homocigosis Doble heterocigosis	C557→T	Mutación puntual	Ala156→Val Variante Bolzano, unión anormal de FVW, normal de trombina
	Doble heterocigosis	A595-A630→del	Deleción múltiple	Glu181→Lys Proteína no funcional
	Homocigosis	C625-C627→del	Deleción	Leu179→del Variante Nancy I, pérdida de función
	Homocigosis	715T→A	Mutación puntual	Cys209→Ser209 GPIbα no se une a GPIbβ
	Doble heterocigosis	805A→G	Mutación puntual	Met239→Val Mayor afinidad por FVW Enfermedad seudo-von Willebrand
	Doble heterocigosis	G1119→A	Mutación sin sentido	Trp343→stop
	Homocigosis	C1421→A	Mutación sin sentido	Ser444→stop
GPIbβ	Doble heterocigosis	C133→G	Mutación puntual	Cambio del sitio de unión de GAA en el promotor
	Homocigosis	G159→A	Mutación puntual	Trp21→stop
	Doble heterocigosis	A360→G	Mutación puntual	Tyr88→Cys GPIbβ no asociada a GPIbα
	Doble heterocigosis	G419→C	Mutación puntual	Ala108→Pro GPIbβ no asociada a GPIbα
GPIX	Homocigosis	T37→G	Mutación puntual	Cys8→Arg
	Doble heterocigosis	A77→G	Mutación puntual	Asp21→Gly
	Homocigosis Heterocigosis	A143→G	Mutación puntual	Asn45→Ser
	Homocigosis	T179→C	Mutación puntual	Phe55→Ser
	Homocigosis	G233→A	Mutación puntual	Cys73→Tyr
	Homocigosis	G305→A	Mutación puntual	Cys97→Tyr
	Homocigosis	G393→A	Mutación sin sentido	Trp126→stop

Clínica. La sintomatología característica del SBS se centra en episodios de hemorragia, fundamentalmente de localización cutáneo-mucosa, que se presentan desde la infancia, pero pueden ser no reconocidos hasta la tercera o cuarta década. Los más comunes son epistaxis (70%), equimosis espontáneas (58%), metrorragias (44%), gingivorragias (42%), y sangrados gastrointestinales (22%). La intensidad de estos procesos de sangrado es variable, pudiendo aumentar o disminuir con la edad. El riesgo de sangrado frente a cirugía, extracciones dentarias, o traumáticos es muy alto.

Laboratorio. El SBS debe ser considerado en el diagnóstico diferencial de cualquier paciente que presente un historial de sangramiento prolongado, en especial si esto comenzó en la infancia. El diagnóstico de laboratorio del SBS se establece con un tiempo de sangría prolongado, trombocitopenia moderada a severa, y la presencia de macroplaquetas, algunas incluso del tamaño de los linfocitos. La clave del diagnóstico del SBS es la deficiente aglutinación plaquetaria inducida con agentes como el antibiótico ristocetina o el veneno botrocetina, proceso que requiere una adecuada interacción entre el FVW y el complejo GPIb-IX-V. Por el contrario, la agregación plaquetaria inducida por otros agentes (ADP, adrenalina o colágeno) es normal o mínimamente alterada. El análisis de la expresión de GPs de membrana (mediante ensayos de unión con anticuerpos específicos marcados radiactivamente, citometría de flujo, técnicas electroforéticas, u otros métodos) lleva a confirmar la disminución o ausencia de los elementos constituyentes del complejo Ib-IX-V. Mediante citometría de flujo se demuestra una marcada reducción de CD42a (GPIX) y CD42b (GPIbα).

Pruebas complementarias para el diagnóstico de laboratorio del SBS son una menor interacción ex vivo de las plaquetas con superficies recubiertas de FVW, o la ausencia de agregación plaquetaria ante la exposición a altas velocidades de turbulencia (alto “shear rate”).

Tratamiento. La terapéutica de los pacientes SBS se fundamenta en primer lugar en medidas educativas de conducta, a fin de evitar situaciones de riesgo traumático. Así, la higiene dental y la vigilancia odontológica para evitar intervenciones dentales, son recomendaciones primarias, así como también evitar deportes de alto riesgo y aplicar presión en caso de epistaxis. Dentro de las medidas preventivas, también debe considerarse educar a los pacientes y sus familiares sobre medicamentos que pueden aumentar el riesgo de sangrado, así como también comidas, hierbas medicinales que puedan alterar la función o recuento plaquetario. La anemia, generalmente leve a moderada y que se presenta mayoritariamente en las mujeres, puede tratarse con aporte farmacológico de hierro. El uso de fármacos antifibrinolíticos como ácido tranexámico, utilizado de manera exitosa en el manejo del sangrado mucocutáneo, o de desmopresina (DDAVP) puede ser útil en algunos individuos SBS, pero no hay certeza de su eficacia generalizada en todos los pacientes, en especial DDAVP debido al complejo GPIb-IX-V defectuoso. Existen reportes de uso de factor VII recombinante, el cual fue aprobado para su utilización en casos de sangrado excesivo. La transfusión de concentrados plaquetarios es hoy día la terapia estándar para prevenir o tratar las hemorragias, a pesar del riesgo implícito de isoinmunización y transmisión de enfermedades.

Por último, en mujeres se ha sugerido que los anticonceptivos orales pueden ser beneficiosos para el control de las menorragias.

b) Síndrome de seudo-von Willebrand

La enfermedad de seudo-von Willebrand, o enfermedad de von Willebrand plaquetaria, tiene una gran similitud fenotípica con la enfermedad de von Willebrand tipo 2B, pero su diferencia radica en que la causa del seudo-von Willebrand no es un defecto hereditario en la síntesis y/o función del FVW, sino en la expresión en la superficie de las plaquetas de un complejo Ib-IX-V con una extraordinaria capacidad de unión al FVW plasmático. Posee una herencia autosómica dominante causada por mutaciones de ganancia de función del receptor de FVW en las plaquetas. Se manifiesta por una hiperagregabilidad plaquetaria a dosis bajas de ristocetina o botrocetina, (también presente en la enfermedad de von Willebrand tipo 2B). Esta hiperreactividad conduce a la agregación plaquetaria espontánea y aclaramiento de las plaquetas y del FVW del plasma. Consecuencia de ello, es una trombocitopenia habitualmente leve, un tiempo de sangría moderadamente prolongado, y niveles disminuidos de FVW con una desproporcionada reducción de las formas de alto peso molecular. Asimismo, las plaquetas de pacientes con seudo-von Willebrand muestran una pobre capacidad de adhesión a superficies subendoteliales bajo condiciones de circulación a alta velocidad de turbulencia.

Recientemente, se han identificado cuatro mutaciones puntuales en varias familias afectadas de seudo-von Willebrand. Estas mutaciones se localizan en el dominio funcional aminoterminal del gen que codifica la GPIbα en el cromosoma 17, lo cual resulta en un deterioro de la función hemostática del FVW debido a la remoción acelerada de los multímeros de FVW de la circulación. Son los cambios Gly/Val en el aminoácido 233, Met/Val en residuo 239, Gly/Ser en el aminoácido 233 y una eliminación de 27 pares de bases. El hecho de que estos residuos se localizan en el bucle de la Ibα que separa la región de dominios ricos en leucina de la secuencia de tirosinas sulfatadas implicada en la unión del FVW, hace pensar que tales residuos son cruciales para la adecuada orientación espacial del dominio funcional de la GPIbα. De hecho, estudios de modelado molecular sugieren que la sustitución Met239Val produce un cambio conformacional relevante en la GPIbα.

Los pacientes con seudo-von Willebrand manifiestan sangrado mucocutáneo leve a moderado. Su manejo terapéutico en lo referente a las medidas educativas genéricas es similar al usado en pacientes con SBS. En función de la intensidad hemorrágica, y de la severidad de la trombocitopenia, se ha de considerar como opción la transfusión de plaquetas. En la prevención y resolución de eventos hemorrágicos, se ha de tener presente que el uso de agentes que aumenten la concentración plasmática de FVW (por ejemplo con concentrados comerciales de FVIII/FVW, o la administración de desmopresina) tiene el riesgo potencial de agravar la trombocitopenia, por la mayor velocidad de aclaramiento de las plaquetas con FVW unido. En algunos pacientes se ha usado con éxito la infusión de dosis bajas de crioprecipitado, sin causar trombocitopenia.

2.1.2. Patología de los receptores plaquetarios del colágeno: complejo glicoproteico Ia-IIa, GPVI, GPIV

El colágeno subendotelial también es importante en el proceso de adhesión plaquetaria, especialmente en sitios con flujos sanguíneos de baja velocidad de turbulencia ("low shear rate"). El colágeno no solo favorece la adhesión inicial de las plaquetas a esta estructura, sino también es un importante agonista que potencia y contribuye a la subsiguiente activación y agregación de las plaquetas, favoreciendo la formación del trombo hemostático. En la actualidad, las glicoproteínas (GPs) plaquetarias reconocidas como los principales receptores del colágeno del subendotelio son el complejo GPIa-IIa, y la GPVI. No obstante, se ha sugerido que otras proteínas como el complejo GPIb-IX-V o la GPIV puedan participar, directa o indirectamente, en esta función.

a) Patología del complejo GPIa-IIa

El receptor GPIa-IIa es un heterodímero formado por la asociación no covalente de las integrinas adhesivas Ia (α2) y IIa (β1). Este complejo se corresponde con el heterodímero VLA-2 de los linfocitos. Los genes que codifican estas GPs han sido secuenciados y, como los de otros receptores plaquetarios (Ib-IX-V o GPIIb-IIIa), son genes altamente polimórficos. La deficiencia de GPIa-IIa se asocia a hemorragias mucocutáneas de moderada intensidad. Un polimorfismo silente 807C/T en el gen de la GPIa, ligado al sistema antigénico HPA 5a/b, parece determinar por un mecanismo no aclarado el grado de expresión del complejo Ia-IIa en la superficie plaquetaria. Varios estudios han analizado el papel de este polimorfismo en la incidencia de enfermedad cardiovascular obteniendo resultados no concluyentes. También se ha descrito la aparente influencia del polimorfismo en la susceptibilidad al sangrado de pacientes con bajos niveles de FVW plasmático o plaquetario, y en la variable adhesión plaquetaria al colágeno que muestran individuos sanos.

Como otras integrinas, el complejo GPIa-IIa parece experimentar una transformación conformacional para aumentar la interacción con su ligando. Así, en recientes estudios, usando fragmentos solubles de colágeno se ha mostrado que la unión de colágeno a GPIa-IIa aumenta tras la activación de las plaquetas por distintos agonistas. El mecanismo subyacente al cambio conformacional que sufre la GPIa-IIa tras la activación de las plaquetas es aún oscuro, pero parece implicar a otros receptores como GPVI, el otro receptor del colágeno, o los receptores de ADP. Asimismo, parece que los dominios intracitoplasmáticos ricos en cisteína de la cadena IIa tienen un papel principal en la activación conformacional de este receptor de colágeno.

Se han descrito dos casos de trastornos hemorrágicos asociados a deficiencia de GPIa-IIa en mujeres en las que curiosamente se observó la recuperación de la reactividad plaquetaria al colágeno al alcanzar la menopausia, lo que sugiere cierta dependencia hormonal de la expresión de este receptor. El hecho de que se haya demostrado una amplia variabilidad de expresión de GPIa-IIa en sujetos normales en asociación con el polimorfismo silente 807 C/T, cuestiona si los casos descritos como deficiencias congénitas de este receptor lo son realmente o representan los extremos de menor expresión dentro de la normalidad.

b) Patología de la GPVI

La GPVI tiene una función claramente demostrada de receptor plaquetario para el colágeno (Figura 34-3). GPVI es una proteína transmembrana perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas, cuya estructura recuerda a la de la GPIbα al poseer los dominios globulares de unión al ligando, el extremo amino terminal, bien separados de la superficie plaquetaria por un fragmento mucínico muy glicosilado y rico en serina y treonina que asemeja al macroglicopéptido de GPIbα. La GPVI se asocia en su porción transmembrana con la cadena gamma del receptor Fc, formando un complejo funcional que permite la transmisión de señales de activación por colágeno de forma bidireccional. En esa transmisión de señales juega también un papel relevante la interacción de la porción citosólica de GPVI con las fosforilasas de la familia src como Fyn y Lyn. Este mecanismo de transmisión vía GPVI/Fcγ se asemeja al usado por los receptores inmunes, particularmente los receptores de células T. Se han identificado ciertos agonistas como CRP ("collagen related peptide") o la toxina convulxina, que parecen transmitir señales de activación de forma específica a través de GPVI. La estructura genómica de GPVI consta de ocho exones que codifican una proteína de 339 aminoácidos, 62 kDa tras la glicosilación, restringida a los megacariocitos y las plaquetas.

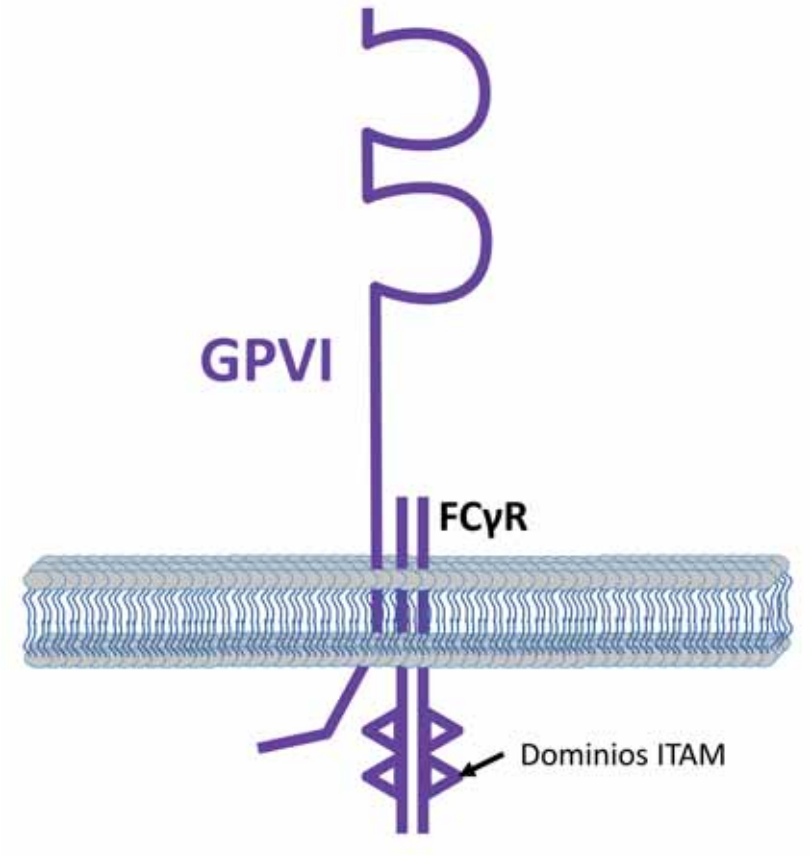


Figura 34-3. Complejo funcional de la GPVI. La GPVI está asociada al Receptor de Fcγ.

Además de los dos receptores mencionados arriba, distintas evidencias sugieren que otras proteínas pueden también tener algún papel en la interacción de las plaquetas con el colágeno. Tal es el caso del complejo GPIb-IX-V que, sobre todo bajo condiciones de flujo de alta velocidad de turbulencia, parece mediar en la unión de las plaquetas a las fibras de colágeno usando al FVW como proteína puente. Así se ha visto que ciertos anticuerpos contra GPIbα inhiben la activación por colágeno. Asimismo, recientes estudios sugieren que la GPV tendría un papel importante en este proceso, ya que las plaquetas de ratones deficientes en GPV muestran una reactividad disminuida a colágeno.

En la población japonesa se ha identificado los únicos casos de pacientes con trastornos hemorrágicos moderados con afectación del receptor GPVI. Uno de ellos se describe como un trastorno hemorrágico adquirido debido a la presencia de autoanticuerpos contra esta proteína. En los otros tres casos, la deficiente adhesión y agregación plaquetaria a colágeno parece causada por la ausencia congénita, menos del 10%, de GPVI en las plaquetas. Hasta la fecha no se han identificado las alteraciones moleculares subyacentes en los casos descritos de deficiencias de la GPVI.

c) Patología de la GPIV

La GPIV, también llamada GPIII o CD36 (88 kDa), es una proteína plaquetaria implicada en la unión a la trombospondina y en la interacción de las plaquetas con los monocitos. Existe controversia acerca de si esta proteína actúa también como receptor de colágeno. Los primeros estudios in vitro sugirieron su participación en la adhesión de las plaquetas a superficies recubiertas de colágeno, y en la transmisión de señales de activación por este agonista. Sin embargo, la prevalencia de individuos con niveles bajos de CD36 es alta, aproximadamente el 3% en las poblaciones japonesa y africana, y un 0.3% de los caucásicos, y estos sujetos agregan normalmente a colágeno y no manifiestan episodios de sangrado.

Por último, se ha sugerido la participación en la interacción colágeno-plaqueta de otras proteínas como CD31, y la potencial existencia de receptores específicos para los subtipos de colágenos I y III.

Globalmente, la información disponible actualmente, pone de manifiesto que distintas proteínas actúan sinérgicamente en la interacción plaqueta-colágeno. Las principales son GPIa-IIa y GPVI, que funcionan coordinadamente bajo un modelo de "dos etapas-dos sitios". Según este modelo, las plaquetas se adhieren inicialmente al colágeno a través de GPIa-IIa, y/o indirectamente a través de FVW-GPIb-IX-V. Esta interacción ocasiona la transmisión de señales de activación que provoca un cambio conformacional del complejo GPIa-IIa para alcanzar su estado de alta afinidad por el colágeno, y un enlentecimiento de la plaqueta que se desplaza sobre el subendotelio expuesto. La GPVI, receptor de menor afinidad para el colágeno, no solo consolida la unión al colágeno, sino que también transmite señales de activación que propician la activación plaquetaria generalizada, la secreción y la agregación.

La importancia fisiológica y la transcendencia clínica de los receptores de colágeno han sido puestas de manifiesto no solo por los avances derivados de estudios *in vitro*, sino también por la identificación de unos pocos pacientes con trastornos hemorrágicos asociados con niveles reducidos de estos receptores, o con la existencia de anticuerpos contra ellos. El primer caso se identificó en la década de los ochenta, y hasta la fecha solo se han descrito no más de 10 sujetos con aparente alteración de los receptores de colágeno, GPIa-IIa o GPVI. Esto representa una incidencia muy baja en comparación con la de otras deficiencias de receptores adhesivos plaquetarios como GPIb-IX-V (SBS) o GPIIb-IIIa (Tromboastenia de Glanzmann). Muy probablemente, la redundancia de receptores para el colágeno es la razón subyacente tanto a la escasez de pacientes identificados con deficiencia específica de la adhesividad y reactividad plaquetaria al colágeno, como del hecho de que los pacientes descritos con déficit singular de Ia-IIa o de CD36 muestren un fenotipo de sangrado moderado o nulo, que no requiere en general tratamiento alguno.

La escasez de pacientes con patología en estos receptores del colágeno, GPs Ia-IIa o VI, los que además presentan un fenotipo de sangrado muy moderado, no debe interpretarse como una evidencia de una participación poco relevante en la función hemostática de las plaquetas, al igual que la ausencia de sangrado espontáneo tras tratamiento con aspirina o clopidogrel no es argumento contra el establecido potencial antitrombótico de estos fármacos. Sin duda, el desarrollo de modelos animales con deficiencias combinadas de los distintos receptores de colágeno ayudará a clarificar su función. Asimismo, nuevos estudios clínico-epidemiológicos permitirán clarificar su papel como factor de riesgo trombótico o hemorrágico, al menos bajo determinadas condiciones fenotípicas, y su posible valor como blanco de nuevos fármacos antitrombóticos.

2.1.3. Defectos hereditarios de la agregación plaquetaria: Tromboastenia de Glanzmann

Para una hemostasia eficaz, las plaquetas inicialmente adheridas a la zona de la lesión tienen que activarse y unirse a las plaquetas vecinas formando agregados de creciente tamaño hasta la formación, con la incorporación de una red de fibrina, del trombo estable que sella la fisura. Este proceso de agregación está mediado principalmente por la formación de puentes de fibrinógeno entre complejos IIb-IIIa de plaquetas vecinas.

El complejo IIb-IIIa es un heterodímero dependiente de la presencia de calcio, formado por las integrinas IIb (136 kDa) y IIIa (110 kDa), asociadas de forma no covalente (Figura 34-4). Este receptor es el más abundante en la membrana plasmática de las plaquetas, alrededor de 50.000 copias en la superficie de las plaquetas no activadas y una cantidad similar en el interior (sistema canalicular y gránulos alfa). Los genes de GPIIb (17 Kb, 30 exones) y de GPIIIa (46 Kb, 15 exones) están localizados en la región q21-23 del cromosoma 17, y muy próximos entre sí, lo que explica su expresión coordinada durante la megacariocitopoyesis.

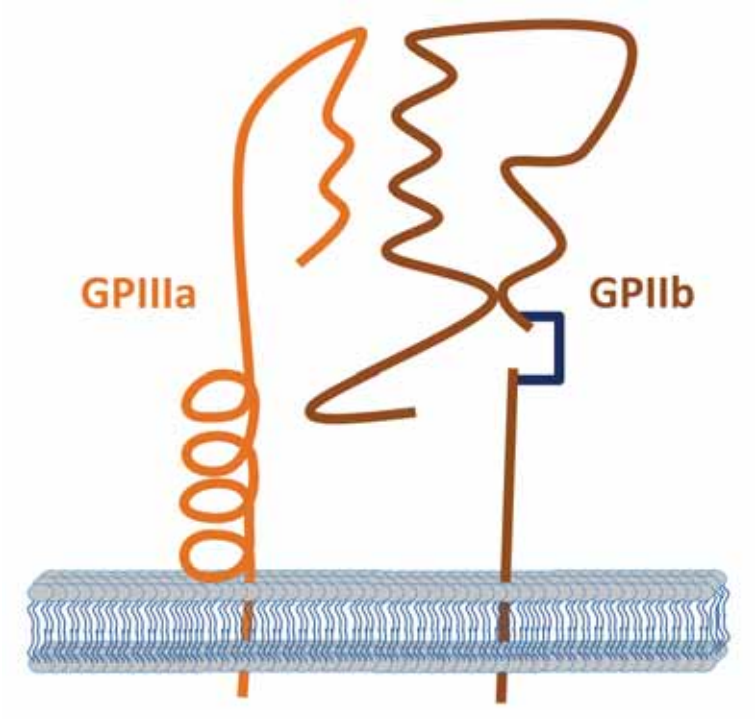


Figura 34-4. Complejo GPIIb-IIIa.

El complejo IIb-IIIa actúa como el principal receptor plaquetario del fibrinógeno, aunque también es capaz de unirse a otras proteínas adhesivas como el FVW, la fibronectina, o la vitronectina, siendo su activación y unión a sus ligandos, esencial para la agregación plaquetaria. La unión a estos últimos ligandos se produce a nivel de una secuencia característica Arg-Gly-Asp (RGD). Estos sitios de unión RGD son crípticos en circunstancias normales, pero resultan expuestos durante el proceso de la activación plaquetaria. Durante la activación de las plaquetas, la señalización celular "inside out" genera un cambio conformacional en la GP IIb-IIIa que permite una unión de alta afinidad por el fibrinógeno, lo cual sirve como puente para otras plaquetas activadas, llegando a formar el tapón plaquetario. Posteriormente, la señalización "outside in" genera la secreción de los gránulos, interacciones con el citoesqueleto, estabilización y retracción del coágulo para consolidar el coágulo de fibrina. Las anomalías congénitas del complejo IIb-IIIa son responsables del trastorno hemorrágico identificado por Eduard Glanzmann en 1918, quien describió un tipo de púrpura que se presentó con recuento y tamaño normal de plaquetas en pacientes con retracción del coágulo normal o disminuida, tiempos de sangrado prolongados, y que posteriormente se conocería como Tromboastenia de Glanzmann (TG) en su honor.

Tabla 34-3. Algunas alteraciones moleculares identificadas en la GPIIb, en pacientes con Tromboastenia de Glanzmann

Genotipo	Exon	Mutación	Fenotipo	Alteración proteica
Homocigoto	4	IVS3(-3)-418del	Deleción en lectura	Ala(106)-Gln(111)del
Heterocigoto Doble	4	480C→ G	Deleción en lectura	Ser(129)-Ser(161)del
	17	1750C→T	Mutación sin sentido	Arg584X(Arg553X)
Heterocigoto Doble	14	1413C→G	Mutación sin sentido	Tyr471X(Tyr440X)
	29	3015insG	Inserción fuera de lectura	Cambio de fase de lectura
Homocigoto	12	1063G→A	Mutación puntual	Glu355Lys(Glu324Lys)
Homocigoto	8	818G→A	Mutación puntual	Gly273Asp(Gly242Asp)
Homocigoto	5	620C→T	Mutación puntual	Thr207Ile(Thr176Ile)
Homocigoto	15	IVS15(+1)G→A	Deleción fuera de lectura	Terminación prematura
Homocigoto	20	IVS19(-2)A→G	Deleción fuera de lectura	Terminación prematura
Heterocigoto Doble	4	526C→G	Mutación puntual	Pro176Ala(Pro145Ala)
	28	2929C→T	Mutación sin sentido	Arg977X(Arg946X)
Homocigoto	12	1073G→A	Mutación puntual	Arg358His(Arg327His)
Homocigoto	5	575-580ins	Inserción en lectura	Arg192Thr193 (Arg161Thr162)
Homocigoto	1	IVS1-9del4.5kb	Deleción fuera de lectura	Terminación prematura
Homocigoto	13	1346G→A	Mutación puntual	Gly449Asp(Gly418Asp)
Homocigoto	6	641T→C	Mutación puntual	Leu214Pro(Leu183Pro)
Heterocigoto Doble	29	IVS29(+2)T→C	Deleción en lectura	Val(951)-Lys(989)del
	30	3094TGins	Inserción fuera de lectura	Cambio de fase de lectura
Heterocigoto Doble	18	IVS17(-1)G→A	Deleción en lectura	Asp(585)-Gln(626)del
Homocigoto	23	2333A→C	Mutación puntual	Gln 778Pro(Gln 747Pro)
Homocigoto	4	526C→T	Mutación puntual	Pro176Ala(Pro145Ala)
Homocigoto	12	1073G→A	Mutación puntual	Arg358H(Arg327H)
Heterocigoto Doble	17	1750C→T	Mutación sin sentido	Arg584X(Arg553X)
	26	IVS25(-3)C→G	Deleción en lectura	Val868-Val909del
Homocigoto	26	2609C→A	Mutación sin sentido	Ser901X(S870X)
Heterocigoto Doble	5	IVS5(+2)C→A	Inserción fuera de lectura	Terminación prematura
	21	2113T→C	Mutación puntual	Cys705Arg(Cys674Arg)
Homocigoto	2	288delC	Deleción fuera de lectura	Terminación prematura
Heterocigoto Doble	12	1063G→A	Mutación puntual	Glu355Lys(Glu324Lys)
	18	1787T→C	Mutación puntual	Ile596Thr(Ile565Thr)

Patogenia. La patología molecular del complejo IIb-IIIa que da lugar a la TG ha sido caracterizada en más de 60 pacientes de distintos lugares de mundo, y puede consultarse de forma actualizada en una base de datos de acceso libre en internet (Glanzmann Thromboastenia Database WWW URL http://med.mssm.edu/glanzmanndb). Las tablas 34-3 y 34-4 resumen la patología mole-

cular (deleciones, inserciones, inversiones, y mutaciones puntuales con y sin sentido) de los genes de las GP IIb y IIIa identificadas hasta ahora en pacientes con TG. Conviene destacar que las alteraciones moleculares responsables de los distintos tipos de TG, son modelos idóneos para el estudio profundo de la biosíntesis del complejo IIb-IIIa, la dependencia estructural de su funcionalidad, y los mecanismos reguladores de la interacción plaqueta-plaqueta. Por otra parte, la identificación precisa de las alteraciones subyacentes en los pacientes con TG abre la puerta a la posibilidad en un futuro, de tratamiento y curación de estos pacientes mediante una terapia génica adecuada.

La TG se transmite, al igual que el SBS, de manera autosómica recesiva, y es causada por defectos cualitativos o cuantitativos en las integrinas αIIb y β3. Su prevalencia en la población general es 1-2 casos por millón de habitantes, pero es mucho más frecuente en comunidades con alto grado de consanguinidad. En general, la enfermedad se manifiesta con relevancia clínica exclusivamente en sujetos homocigotos, mientras que los sujetos heterocigotos son asintomáticos, incluso cuando tienen solo el 50% de moléculas de complejo IIb-IIIa.

La TG es una enfermedad heterogénea, a semejanza del SBS. Históricamente se han definido dos tipos de TG. El tipo I se caracteriza por la ausencia en la expresión de GPIIb-IIIa en la membrana plaquetaria (solo existe alrededor de <5% de su expresión normal), la carencia de fibrinógeno acumulado en los gránulos plaquetarios, y la falta de retracción del coágulo, siendo el subtipo más común y representando alrededor del 78% de los pacientes con TG. Por el contrario, en la TG tipo II se presenta una reducida expresión de GPIIb-IIIa (alrededor de 5% - 20% de su expresión normal), cierta cantidad de fibrinógeno granular (30-60% del contenido normal), y ocurre la retracción del coágulo aunque está disminuida, constituyendo cerca del 14% de los casos. Esta clasificación de la TG es útil para describir a los pacientes tromboasténicos clásicos, y tratar de asociar su sintomatología con las alteraciones moleculares subyacentes, pero no implica la existencia de categorías distintas de la enfermedad. Además, se ha identificado un tercer subtipo de TG, en la cual se presentan niveles normales de la integrina, pero la proteína no es funcional. En este caso, la deficiencia de GPIIb-IIIa es cualitativa y no cuantitativa, y representa alrededor del 8% de los casos de TG

Tabla 34-4. Algunas alteraciones moleculares identificadas en la GPIIIa, en pacientes con Tromboastenia de Glanzmann

Genotipo	Exon	Mutación	Fenotipo	Alteración proteica
Homocigoto	2	IVS2(+1)G→T	Deleción fuera de lectura	Terminación prematura
Homocigoto	4	563C→T	Mutación puntual	Ser188Leu(Ser162Leu)
Homocigoto	9	IVS9ins3-4kb	Inserción fuera de lectura	Sin transcripción
Homocigoto	5	718C→T	Mutación puntual	Arg240WTrp(Arg214Trp)
Homocigoto	4	433G→T	Mutación puntual	Asp145Tyr(Asp119Tyr)
Homocigoto	9	1199G→A	Mutación puntual	Cys400Tyr(Cys374Tyr)
Homocigoto	5	719G→A	Mutación puntual	Arg240Gln(Arg214 Gln)
Homocigoto	3	262C→T	Mutación sin sentido	Arg88X(Arg62X)
Heterocigoto Doble	1	IVS1-5Aluinv15kb + IVS1del11kb	Inversión/Deleción	Sin transcripción
	5	IVS5(+1)G→A	Deleción/Inserción fuera de lectura	Terminación prematura
Heterocigoto Doble	6	917A→C	Mutación puntual	His306Pro(His280Pro)
	11	1757G→T	Mutación puntual	Cys586Phe(Cys560Phe)
Homocigoto	8	1053-1058del	Deleción/Inserción, en lectura	351-353del Met351ins
Homocigoto	11	1702T→C	Mutación puntual	Cys568Arg(Cys542Arg)
Homocigoto	13	2031-2041del	Deleción fuera de lectura	Terminación prematura
Homocigoto	9	IVS9Alu-2163 o 2166del11.2kb	Deleción fuera de lectura	Terminación prematura
Heterocigoto Doble	6	847delGC	Deleción fuera de lectura	Terminación prematura
	6	863T→C	Mutación puntual	Leu288Pro(Leu262Pro)
Homocigoto	4	428T→G	Mutación puntual	Leu143Trp(Leu117Trp)
Homocigoto	11	1758 T→C	Mutación puntual	Cys586Arg (Cys560Arg)
Homocigoto	4	433G→A	Mutación puntual	Asp145Asn(Asp119Asn)
Homocigoto	6	917A→C	Mutación puntual	Hys306Pro(Hys280Pro)
Heterocigoto Doble	15	2332T→C Desconocido	Mutación puntual Desconocido	Ser778Pro(Ser752Pro)
Heterocigoto Doble	11	1791delT	Deleción fuera de lectura	Sin transcripción
	15	2248C→T	Mutación sin sentido	Arg750X(Arg724X)
Homocigoto	9	1260G-A+1143C A	Deleción/Inserción, en lectura	Lys(350)-Ser(396)del/ Val(350)Ser(351)ins
Homocigoto	5	725G→A	Mutación puntual	Arg242Gln(Arg216Gln)
Homocigoto	12	1924G→T	Mutación sin sentido	Gln642X(Gln616X)
Homocigoto	5	718C→T	Mutación puntual	Arg240Trp(Arg214Trp)
Heterocigoto Doble	6	917A→C	Mutación puntual	Hys306Pro(Hys280Pro)
	11	1813G→A	Mutación puntual	Gly605Ser(Gly579Ser)

Laboratorio. Los principales hallazgos de laboratorio en los pacientes con TG son tamaño y recuento plaquetario normal, y si el sangrado es severo o crónico se puede presentar con niveles disminuidos de hemoglobina y microcitosis secundario a un déficit de hierro, en las pruebas de coagulación se encuentran valores normales en tiempo de protrombina (TP), tiempo de tromboplastina activada (TTPA) y fibrinógeno. La agregometría plaquetaria es el método gold estándar en el diagnóstico clínico de TG, a pesar de necesitar un gran volumen de muestra y

que su procesamiento sea inmediato, donde la disminución o ausencia de agregación (<10%) en respuesta a múltiples agonistas plaquetarios (ADP, colágeno, ácido araquidónico y trombina), junto con una aglutinación normal en respuesta a ristocetina (mediada por GP Ib-IX-V), corresponde al patrón clásico observado en pacientes con TG. Mediante citometría de flujo se puede estudiar la expresión de las GPs, el cual puede realizarse utilizando un bajo volumen de muestra, pero no detectará el subtipo III que es causado por defectos cualitativos y no cuantitativos en la GP IIb/IIIa. A diferencia del SBS, las plaquetas tromboasténicas se unen normalmente a fibras de colágeno, y al tejido subendotelial expuesto, aunque la agregación subsiguiente está severamente reducida al no producirse el adecuado proceso de activación mediado por el complejo IIb-IIIa. La actividad procoagulante de estas plaquetas se describió como reducida en los primeros estudios, pero posteriormente se ha mostrado como normal en distintos pacientes.

Clínica. La naturaleza del sangrado en la TG incluye casi siempre púrpura, menorragia (60% - 90%) especialmente en la menarquia, epistaxis (60% - 80%) y sangrado gingival (20% - 60%). El sangrado gastrointestinal en forma de melena se encuentra presente en el 10% - 20% de los casos y alrededor de un 1% a 2% de los casos desarrolla hemorragia intracraneal. El sangrado por traumas o quirúrgico puede ser severo, frecuente por ejemplo en las extracciones dentales sin previa profilaxis y ocurrir luego de un mínimo trauma. La menorragia es muy prevalente en las mujeres, teniendo un alto riesgo de sangrado severo durante la menarquia, debido a la prolongada influencia de los estrógenos. El embarazo y sobre todo el parto y el puerperio, son también situaciones de alto riesgo hemorrágico para estos pacientes. La severidad de las hemorragias en la TG es impredecible, pues varía considerablemente entre los pacientes, incluso entre familiares directos, y tiende a disminuir con la edad. No obstante, se puede clasificar la TG como una enfermedad hemorrágica severa, pues la mayoría de los pacientes afectados que sangran requieren soporte transfusional.

Tratamiento. El manejo clínico de los enfermos con TG guarda semejanza con el de pacientes SBS, y debe incluir en primer lugar medidas educativas de comportamiento genérico (higiene bucal, revisión médica rutinaria, etc.). Se debe proveer soporte transfusional previo a la realización de procedimientos invasivos, incluso en pacientes sin historia previa de sangrado severo. La alta probabilidad de recibir transfusiones también hace recomendable la administración precoz de vacunas contra la hepatitis. Asimismo, se recomienda el uso de productos filtrados para disminuir el riesgo de aloinmunización y transmisión de CMV, y si es posible, de plaquetas HLA compatibles. Además del riesgo de inmunización HLA, similar a la de otros sujetos, en los pacientes con TG existe el riesgo adicional de isoinmunización y generación de anticuerpos contra el complejo IIb-IIIa, donde el 30% de los pacientes puede desarrollarlos, lo cual provoca que se vuelvan ineficaces las plaquetas transfundidas. Frente a esta situación, se recomienda que las transfusiones de plaquetas se realicen para cirugías mayores, hemorragias que pongan en riesgo la vida del paciente y hemorragias significativas que no presenten respuesta a los tratamientos. Ante un cuadro hemorrágico agudo en un paciente TG con un alto título de anticuerpo anti-GPIIb-IIIa, puede plantearse la conveniencia de realizar un recambio plasmático.

En algunos enfermos el uso de agentes antifibrinolíticos, ácidos ε-aminocaproico o tranexámico, puede ser útil para la profilaxis del sangrado en situaciones como las extracciones dentarias, pero su eficacia generalizada no está demostrada. Igualmente se ha sugerido la utilidad de agentes tópicos (celulosa empapada en ácido tranexámico, trombina local, microfibras de colágeno) para el control del sangrado mucoso activo en la TG. El factor VII recombinante (rFVIIa) se encuentra aprobado por la Agencia Europea de Medicina (EMA) y por la FDA para el tratamiento de pacientes con TG, lo cual ha permitido mejores resultados hemostáticos en todos los pacientes, en especial en aquellos pacientes que no responden a los tratamientos con plaquetas. Aunque se han producido casos de tromboembolismo durante la terapia con rFVIIa en pacientes con TG, continúa siendo un medicamento seguro para estos pacientes, con bajas tasas de efectos adversos. Por último, dos pacientes con TG han sido sometidos a trasplante de médula ósea con resultados satisfactorios. Combinado con la terapia de transferencia génica, el trasplante de progenitores hematopoyéticos podría ser una opción interesante para los pacientes con las formas más graves de TG en un futuro próximo.

2.1.4. Defectos congénitos de la secreción plaquetaria

La secreción plaquetaria depende en parte de los receptores de GPs (ejemplo GPIIb-IIIa, GPIb-IX-V, y GPVI) y de los receptores acoplados a proteína G (ejemplo PAR1, P2Y12 y TXA2R) que generan caminos de señalización complejos que finalizan con la respuesta plaquetaria (Figura 34-5).

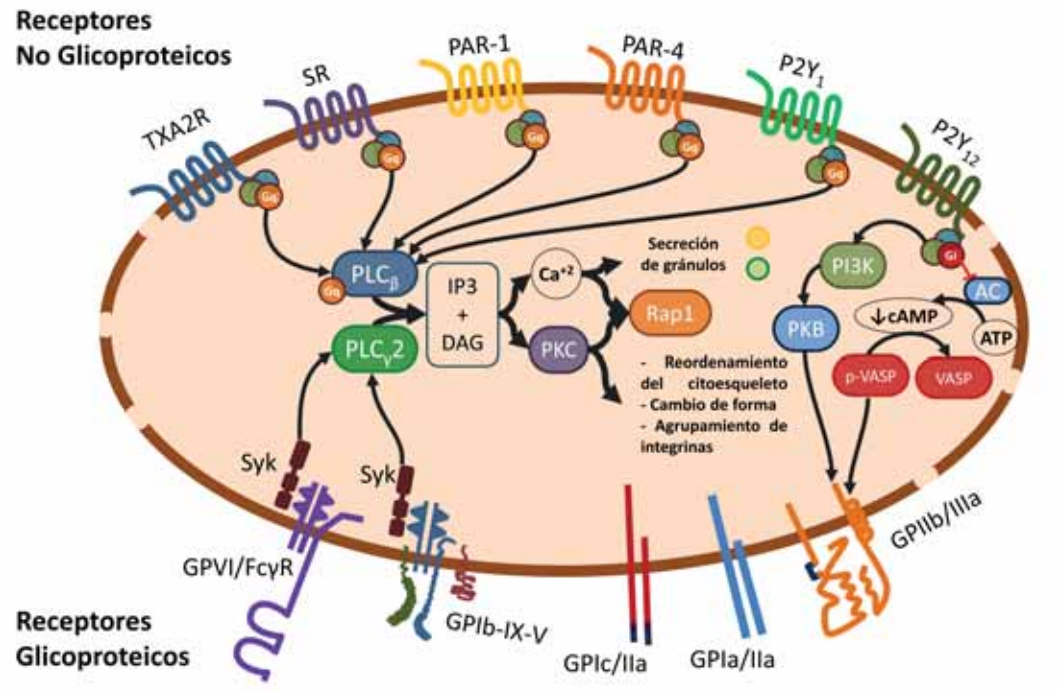


Figura 34-5. Principales receptores y vías de señalización plaquetaria. PLC, Fosfolipasa C; TXA2R, Receptor de Tromboxano A2; Sr. Receptor de Serotonina (5-Hidroxitriptamina); PAR-1 y PAR-4, Receptores de Trombina; P2Y1 y P2Y12, Receptores de ADP.

Tras la adhesión al subendotelio, las plaquetas sufren un cambio estructural y morfológico, desarrollando pseudópodos, e inician una reacción de liberación por la cual los productos contenidos en los gránulos α (factor 4 plaquetario, β-tromboglobulina, trombospondina, fibronectina, factor V, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), fibrinógeno, FvW, factor de crecimiento transformante β (TGF-β), P-selectina, CD63 y GP IIb/IIIa) y de los gránulos δ (ADP, ATP, calcio, serotonina) son liberados al exterior. La exteriorización del contenido de los gránulos tiene lugar a través de una reacción de exocitosis, por la que las membranas de los organelos se fusionan con los del sistema canalicular abierto tras el aumento en la concentración de calcio citoplasmático. El proceso de liberación amplifica la activación, que como consecuencia conlleva la agregación plaquetaria. Las alteraciones congénitas en el almacenamiento plaquetario comprenden un grupo heterogéneo de trastornos en que puede existir una deficiencia de gránulos o de su contenido. Básicamente, se clasifican como defectos aquellos que afectan a los gránulos densos (deficiencia de almacenamiento de gránulos δ), a los gránulos α (deficiencia de almacenamiento de gránulos α o síndrome de las plaquetas grises), o tanto a gránulos densos como α (deficiencia de gránulos δ y α). En conjunto, estas alteraciones cursan con una diátesis hemorrágica moderada, que se caracteriza por tendencia al sangrado mucocutáneo espontáneo tras intervenciones quirúrgicas o en el postparto. El tiempo de sangría por lo general está aumentado, y sobre todo, se incrementa de forma marcada tras la ingesta de aspirina. Generalmente se observa ausencia de la segunda onda de agregación tras activación con ADP o epinefrina, y una disminución de la agregación al colágeno o trombina.

a) Síndrome de las plaquetas grises

El síndrome de plaquetas grises corresponde a un desorden plaquetario recesivo con anormalidades en los gránulos α y mutaciones en NBEAL2, el cual se caracteriza por una ausencia de gránulos α reconocibles morfológicamente en las plaquetas y en los megacariocitos de los individuos afectados, mientras que los gránulos δ, lisosomas, mitocondrias, peroxisomas están preservados. Según un estudio donde se evaluó a 14 familias de Israel para poder determinar la transmisión genética de esta patología, evidenciaron que 6 familias eran consanguíneas y 6 familias tenían múltiples individuos afectados con padres no afectados, lo cual apoyó la herencia de tipo autosómica recesiva. Como consecuencia, las plaquetas muestran una deficiencia severa, aunque no una ausencia completa de proteínas sintetizadas en el megacariocito y contenidas en los gránulos α. Sin embargo, la GP plaquetaria característica de la membrana de este tipo de gránulos, la P-selectina (GMP-140), sí está presente y se externaliza en cantidades normales tras activación con trombina, indicativo de que con la pérdida de NBEAL2 resulta en la pérdida de los gránulos α pero no de P-selectina. El defecto en este síndrome parece residir en la incapacidad para el almacenamiento en los gránulos α de las proteínas endógenas sintetizadas por megacariocitos. Así, la liberación al estroma medular del factor de crecimiento derivado de plaquetas puede explicar la fibrosis medular observada en estos casos, y este defecto en el almacenamiento también puede ser responsable de concentraciones plasmáticas elevadas de factor 4 plaquetario y de β-tromboglobulina.

Clínicamente se caracteriza por manifestaciones mucocutáneas hemorrágicas moderadas, y fundamentalmente con sangrado postquirúrgico o postraumático, aunque también puede ser asintomática, también presentan hematomas con facilidad, epistaxis y en algunos pacientes se han observado sangramientos severos. En un modelo de ratón *Nbeal2 -/-* que posee las características de este síndrome, incluye sangramiento, trombocitopenia, ausencia de gránulos α, esplenomegalia y fibrosis en la médula ósea. Es también típica una macrotrombocitopenia moderada, con cifras que pueden variar en un mismo individuo a lo largo de su vida (25 a 150 x 109/litro). El frotis de sangre periférica muestra plaquetas grandes, pálidas, con formas ovales, donde el color gris es proveniente de la ausencia del color rojo-púrpura de los gránulos α en la tinción de Wright de sangre periférica. El aspirado medular muestra un número aparentemente normal de megacariocitos, con un incremento en la trama reticulínica, fundamentalmente alrededor de estos. Los estudios de agregación plaquetaria son variables: generalmente se observan defectos en la agregación a trombina y colágeno, mientras que con ADP o epinefrina tienden a estar menos alteradas. Sin embargo, también se han descrito agregaciones normales a todos los agonistas. Los estudios inmunológicos o la electroforesis en gel de poliacrilamida demuestran la deficiencia en las proteínas α granulares como fibrinógeno, FVW, trombospondina, factor 4 plaquetario, factor de crecimiento derivado de plaquetas y β-tromboglobulina en lisados de plaquetas o en el sobrenadante tras su activación, mientras que también se puede realizar cuantificación del contenido de los gránulos α a través de inmunofluorescencia para proteínas de estos gránulos, como trombospondina-1 y factor plaquetario 4 como se mencionó anteriormente. La técnica gold estándar para su detección es la microscopia electrónica, mostrando ausencia o marcada reducción de los gránulos α y vacuolización del citoplasma.

Las medidas generales para el tratamiento de esta enfermedad son similares a las de la TG. La respuesta a la desmopresina es variable, pero parece mejorar en parte la función hemostática, y los pacientes también se pueden beneficiar de la terapia antifibrinolítica. El tratamiento de los episodios hemorrágicos severos requiere la transfusión de concentrados de plaquetas.

b) Deficiencia en el almacenamiento de gránulos δ

La deficiencia en gránulos δ corresponden a patologías plaquetarias que llevan a síndromes hemorrágicos de severidad variable y asociadas a deficiencias cualitativas y cuantitativas en los gránulos densos. Estas patologías pueden presentarse de 2 formas, como sindrómicas y como no sindrómicas. La forma sindrómica incluye las enfermedades de Chediak-Higashi, síndrome de Hermansky-Pudlak, el cual tiene una base molecular heterogénea, con la participación de diferentes genes y síndrome de Griscelli, las cuales se asocian a deficiencias inmunes y albinismo oculocutáneo con desorden en la función plaquetaria, correspondiendo a una herencia autosómica recesiva. En ausencia de otras anomalías congénitas o de una deficiencia asociada de gránulos α, la deficiencia de gránulos δ se transmite como rasgo autosómico dominante. Por otro lado,

los no sindrómicos pueden deberse a la ausencia o reducción en el número de gránulos densos, un defecto cualitativo en estos o en ambos.

Las otras formas de deficiencias de gránulos δ con alteraciones constitucionales (síndromes de Hermansky-Pudlak, Chediak Higashi y la trombocitopenia con ausencia de radio) tienen una herencia autosómica recesiva, excepto el síndrome de Wiskott Aldrich, que lo hace como rasgo ligado al cromosoma X. En el caso del síndrome de Hermansky-Pudlak se han descrito 10 subtipos humanos (HPS1 – HPS10), siendo los subtipos HPS-1 y HPS-3 los más comunes en Puerto Rico. En este síndrome, el gen para HPS1, se localiza en el cromosoma 10q23.1, tiene 20 exones, y codifica una proteína de 700 aminoácidos cuya función es todavía poco clara pero que parece estar implicada en la organelogénesis, el gen HPS2, también llamado AP3BA, codifica la subunidad B3A del complejo adaptador AP3, que juega un papel clave en la formación de vesículas y el almacenamiento de proteínas, a partir de estructuras membranosas como el aparato de Golgi.

En la deficiencia de gránulos δ, el contenido granular de ADP, ATP, serotonina, calcio y pirofosfato están disminuidos. La relación ATP/ADP, medida en lisados plaquetarios está aumentada, lo que traduce niveles normales de ATP en otros compartimientos generados para el metabolismo plaquetario. La disminución de ADP, y posiblemente de serotonina, secretados por las plaquetas, contribuye en la alteración funcional y en la propagación del tapón hemostático.

La deficiencia de gránulos δ se caracteriza por un moderado síndrome hemorrágico, con sangrado mucocutáneo, como epistaxis, petequias, menorragia, y sangrado postquirúrgico o postparto, además de hipopigmentación de la piel, inmunodeficiencia, albinismo oculocutáneo. Los pacientes con deficiencias de gránulos δ como parte del síndrome de Hermansky-Pudlak suelen tener hemorragias más severas e incluso pueden ser letales. Aunque los recuentos de plaquetas pueden estar discretamente disminuidos, por lo general son normales. Los estudios de agregación son variables, habiéndose descrito un número de pacientes con deficiencias de gránulos δ y normalidad en estos análisis. Generalmente, la segunda onda de agregación con ADP suele estar ausente cuando se utiliza plasma rico en plaquetas para el ensayo de agregación, existiendo también una disminución en la amplitud máxima de la agregación inducida por colágeno; mientas que la agregación inducida por colágeno muestra anomalías más pronunciadas con plaquetas lavadas y no se observan las mismas anomalías al utilizar ADP como agonista, lo cual puede deberse a que en presencia de calcio, el ADP no induce degranulación de las plaquetas o generación de tromboxano A2. La valoración de la respuesta a dosis elevadas de trombina (máxima liberación) ayuda a distinguir las alteraciones de la liberación (agregaciones normales) de las deficiencias en los gránulos (agregaciones reducidas). El luminómetro o el lumiagregómetro permite comprobar una reducción en la liberación de ATP mediante análisis de la luminiscencia, además mediante HPLC es posible determinar ATP y ADP. En este sentido, el radio ATP/ADP se encuentra aumentado, lo cual apoya el diagnóstico de una deficiencia en los gránulos densos. La mepacrina, debido a su alta afinidad por el ATP se localiza en los

gránulos densos, y la reducción de la fluorescencia emitida medida mediante microscopía electrónica o citometría de flujo contribuye al diagnóstico. El análisis bioquímico de diferentes sustancias intragranulares, como el ATP, ADP, calcio o serotonina está reducido. La ^{14}C-serotonina es captada en plaquetas deficientes en gránulos δ, pero puesto que no puede ser incorporada en estos organelos, se cataboliza rápidamente. En estudios de secreción plaquetaria usando ^{14}C-serotonina, se observa característicamente un porcentaje de incorporación menor al normal en estos pacientes. Aunque en las plaquetas carentes en gránulos densos una proporción importante de la serotonina es catabolizada, en pacientes con síndrome de Hermansky-Pudlak la pérdida del marcador radioactivo es todavía más acusada. La reducción o la ausencia de gránulos densos pueden ser confirmadas por microscopía electrónica de plaquetas fijadas en presencia de calcio.

Las medidas generales para el tratamiento de esta enfermedad son similares a las indicadas en deficiencias de gránulos α. La transfusión de plaquetas es el tratamiento más efectivo en episodios de sangrado de pacientes con deficiencias de gránulos δ, pero debido a su carácter moderado, a veces estas no son necesarias. Los crioprecipitados pueden corregir el tiempo de sangría en estos pacientes, pero el mecanismo de este beneficio es aún desconocido. Lo mismo ocurre con la desmopresina, que también puede ser de utilidad en un número de pacientes con este defecto. Por otro lado, como algunos pacientes presentan albinismo, es importante que se protejan del sol y de la radiación ultravioleta.

c) Deficiencia combinada de gránulos α y δ

La deficiencia combinada de gránulos α y δ es definida como la ausencia o deficiencia severa de los gránulos α y δ. Por lo general, la reducción en gránulos δ es mayor que la de α. A diferencia del síndrome de las plaquetas grises, en la que la P-selectina está presente en cantidades normales, el contenido en las plaquetas de pacientes con deficiencias combinadas está reducido, lo que facilita el diagnóstico. Otros hallazgos de laboratorio, sus manifestaciones clínicas y el tratamiento no difieren a los señalados en deficiencias aisladas de gránulos α ó δ. La presentación familiar de estos cuadros sugiere una herencia autosómica, donde se han descrito casos de pacientes de familias no relacionadas con esta deficiencia, la que es debida a mutaciones en GF11B, una proteína tipo dedos de zinc que actúa como represor transcripcional de varios genes.

d) Alteración plaquetaria tipo Quebec

Este es un raro trastorno autosómico dominante, causado por duplicaciones en tándem, que se caracteriza por cifras normales o disminuidas de plaquetas, sangrado mucocutáneo que puede ser severo y muy tardío tras un traumatismo, y que generalmente no responde adecuadamente a transfusiones de plaquetas. Se asocia a un aumento específico en los megacariocitos en la expresión de PLAU (activador del plasminógeno tipo uroquinasa) y la consecuente fibrinólisis dependiente de las plaquetas en este síndrome. Se presenta una generación de

plasmina intraplaquetaria, degradación de las proteínas de los gránulos α (entre ellos el factor V plaquetario), uroquinasa plasmática normal o aumentada, aumento de productos de degradación del fibrinógeno sin aumento del Dímero D, y ausencia de agregación plaquetaria con epinefrina. Refrenda este mecanismo patogénico el hecho que la terapia con inhibidores de la fibrinolisis (ej., ácido tranexámico) es el único tratamiento efectivo conocido en este síndrome.

2.1.5. Defectos hereditarios en los mecanismos implicados en la transmisión de señales de activación plaquetaria

En muchos pacientes la función de las plaquetas está alterada, con fallos en la agregación y/o la secreción, a pesar de la ausencia de alteraciones congénitas de los gránulos plaquetarios o de los receptores adhesivos. En estos casos, es posible que la patología subyacente sea un defecto hereditario de la activación plaquetaria. Este proceso es un complejo fenómeno que incluye la unión de agonistas a sus receptores específicos, la transmisión de señales de activación generalmente por acoplamiento del receptor con proteínas G, la activación de enzimas efectoras como nucleótido ciclasas o fosfolipasas, la generación o movilización de segundos mensajeros (nucleótidos cíclicos, inositoles fosfato, calcio, etc.). Subsiguientemente, se produce la cascada de cambios bioquímicos (fosforilación de proteínas, activación de receptores, secreción etc.) y estructurales (cambio de forma, reorganización del citoesqueleto, emisión de seudópodos) que caracterizan el estado de plaqueta activada. Reconocida la transcendencia fisiológica del proceso de la activación plaquetaria e identificados sus elementos clave, resulta claro que la deficiencia hereditaria de alguno de estos elementos puede reflejarse en un funcionamiento anormal de las plaquetas.

Dada la variedad de elementos potencialmente afectados, los pacientes con deficiencias de la activación plaquetaria constituyen un conjunto muy heterogéneo, que agrupamos más para simplificar la clasificación global de las trombocitopatías, que por verdadera similitud de las alteraciones específicas subyacentes. A pesar de dicha heterogeneidad, estos pacientes se asemejan fenotípicamente, cursando con diátesis hemorrágicas muy moderadas, similares por ejemplo a las de sujetos tratados con aspirina, y de localización muco-cutánea. En general, no requieren tratamiento, y son suficientes las medidas educativas de prevención de riesgo. Ante situaciones de riesgo hemorrágico previsible (exodoncia, intervenciones quirúrgicas), puede plantearse el uso preventivo de desmopresina o antifibrinolíticos, pero en ocasiones las hemorragias son más graves y es necesaria la transfusión de componentes sanguíneos. Considerando el carácter generalmente moderado del trastorno hemorrágico asociado a esta patología, que normalmente no requerirá atención médica, no es de extrañar que una alta proporción de los individuos afectados no sean diagnosticados, y por ello su incidencia es desconocida. No obstante, la mayoría de las disfunciones plaquetarias diagnosticadas en el laboratorio corresponden a esta categoría, con una incidencia global bastante mayor que el de otras trombocitopatías más clásicas como el SBS o la TG.

En ausencia de pruebas más específicas para la caracterización del defecto subyacente, los hallazgos típicos en pacientes con patología de la activación son cifras normales de plaquetas, pruebas de coagulación y nivel de FVW normal, y un tiempo de sangría normal o alargado. El cambio de forma y la aglutinación inducida por ristocetina no suelen estar afectados, mientras que la agregación plaquetaria con dosis moderadas o bajas de la mayoría de agonistas muestra, generalmente, disminución del porcentaje máximo de agregación y/o ausencia de la segunda onda de agregación. A dosis altas de agonistas el patrón de agregabilidad puede normalizarse. En algunos casos se ha conseguido caracterizar de forma precisa la alteración molecular responsable de la alteración funcional de la activación plaquetaria, y estos casos son descritos con más detalle en el siguiente punto (b de 3.1.4).

a) Defectos en los receptores para agonistas

Las plaquetas cuentan con una batería de receptores para múltiples agonistas no adhesivos muy amplia y diversa. La mayoría de ellos, pero no todos, son proteínas pertenecientes a la familia de receptores formados por una única cadena polipeptídica con siete dominios transmembrana, y cuyas porciones intracitosólicas se acoplan a proteínas G que median la transmisión de las señales de activación de las enzimas efectoras. En este grupo se encuadran como principales los receptores para ADP, epinefrina, trombina, factor activador de plaquetas (PAF), vasopresina, serotonina, y tromboxano A_2. Además, para algunos de estos agonistas existen varios subtipos de receptores, y como es obvio todos ellos son blanco potencial de alteraciones moleculares que se traducen en defectos funcionales de la activación.

Las plaquetas poseen tres tipos de receptores purinérgicos para el ADP: P2Y1, P2Y12 y P2X1, donde los dos primeros son receptores acoplados a proteína G, mientras que P2X1 es un canal catiónico no selectivo activado por ATP. P2Y1 activa a la fosfolipasa C plaquetaria y estimula la liberación de calcio desde el almacenamiento intracelular, P2Y12 inhibe a la adenilato ciclasa, y la activación simultánea de P2Y1 y P2Y12 resulta en la agregación plaquetaria. Por otro lado, la estimulación de P2X1 provoca un rápido ingreso de calcio en las plaquetas y puede provocar una sinergia con los efectos de P2Y1 e inducir un cambio de forma en las plaquetas. Se han identificado dos pacientes no relacionados, con una aparente deficiencia congénita de la agregación inducida por ADP. En ambos casos, los estudios con análogos de ADP, mostraron una reducción significativa en el número de sitios de unión. También se constató un patrón anormal de fosforilación inducida por ADP, y la incapacidad de este agonista para inhibir la generación de AMPc en plaquetas estimuladas con prostaglandina E1. Este patrón clínico-funcional es comparable al de sujetos o animales tratados con tienopiridinas, y es sugerente de una deficiencia de los receptores P2Y12. De hecho, en uno de estos pacientes se ha identificado la presencia en heterocigosis de una deleción de dos nucleótidos en el gen del receptor P2Y12, que causa la aparición de un codón “stop” prematuro y la síntesis de una proteína carente de 28 residuos en el extremo amino terminal. Esta alteración se transmite de

forma autosómica recesiva, y su presencia en otros pacientes con afectación de las respuestas al ADP está por demostrarse. No obstante, en algunos pacientes con secreción plaquetaria alterada, pero gránulos y formación de tromboxano A_2 (TXA_2) normales, se sospecha la presencia en heterocigosis de esta u otra alteración molecular del receptor P2Y12. Respecto de los otros receptores de ADP, se han descrito pacientes con una deficiencia congénita del receptor P2Y1, con una deleción de pares de bases resultando en una proteína truncada. También se ha descrito un paciente con un trastorno hemorrágico severo asociado a un defecto hereditario recesivo, consistente en la deleción de una leucina en el segundo dominio transmembrana del receptor P2X1.

Las plaquetas poseen receptores α2-adrenérgicos implicados en la inhibición de la adenilato ciclasa mediante acoplamiento a través de la proteína Gi. La interacción de la epinefrina con su receptor también promueve la agregación inducida por otros agonistas débiles como el ADP, poniendo de manifiesto la importancia fisiológica del sinergismo entre distintos agonistas plaquetarios. Se han descrito tres casos de defectos congénitos de la secreción y/o la agregación inducida por epinefrina, asociados a una disminución significativa de los receptores α2-adrenérgicos. En estos casos, la clínica hemorrágica es discreta, y la alteración molecular subyacente no es conocida.

En contraposición con estas trombocitopatías de deficiencia funcional de los receptores de ADP o epinefrina, se ha descrito un trastorno denominado síndrome de las plaquetas viscosas, caracterizado por una hiperagregación de las plaquetas al estimularlas con estos agonistas. Clínicamente, los pacientes con este síndrome sufren trombosis coronarias o en el sistema nervioso central, frecuentemente asociadas a situaciones de estrés emocional. La base molecular de este exceso de función aún se desconoce, pero se ha asociado a defectos en la des-regulación de las GPs, donde en los últimos años se ha asociado a la GPVI, sin embargo, los resultados que se han obtenido no han sido consistentes.

Una de las consecuencias genéricas de la activación de las plaquetas es la generación de tromboxano A_2, que actúa potenciando la respuesta inicial en la misma y en otras plaquetas. El receptor de TXA_2, del que existen en las plaquetas dos isoformas -α y β- diferenciadas solo en el extremo carboxilo terminal y en su capacidad de activar la adenilato ciclasa, es una proteína con siete dominios transmembrana que activa el ciclo de los fosfoinositoles por acoplamiento a la proteína Gαq. En la mayoría de los tejidos se expresan ambas isoformas, sin embargo, solo la isoforma α se encuentra presente en las plaquetas. En la población japonesa se han identificado familias con trastornos hemorrágicos moderados de transmisión dominante, que presentan una mutación puntual (Arg/Leu 60) en el gen que codifica el receptor plaquetario de TXA_2. Esta mutación, localizada en la porción citoplasmática del receptor, parece afectar su capacidad para transmitir señales de activación tras la unión del ligando.

El PAF o factor activador de plaquetas, es un éter fosfolipídico de propiedades antiinflamatorias producido por las plaquetas, leucocitos y otras células. El PAF

es un potente agonista capaz de inducir secreción y agregación plaquetaria de forma dosis dependiente. Sus respuestas están mediadas por un receptor de siete dominios transmembrana acoplado a proteínas G, que inducen la inhibición de la adenilato ciclasa y a la activación de la fosfolipasa C. Indirectamente, también activa la fosfolipasa A_2 provocando la liberación de ácido araquidónico de la membrana plaquetaria. En 1984 se comunicó anecdóticamente un caso de aparente deficiencia específica de la respuesta plaquetaria a PAF sin detallar el tipo de anomalía, pero no hay constancia en la literatura de otros pacientes con alteraciones similares. Una deficiencia en el receptor de PAF promovería la inflamación, debido a que el PAF exhibiría efectos antiinflamatorios.

Para terminar esta sección es obligado hacer mención sucinta a la trombina, el más potente activador de las plaquetas capaz de inducir respuestas de activación a concentración subnanomolar en cuestión de segundos. Se ha demostrado que el complejo Ib-IX-V actúa como receptor plaquetario para la trombina, lo que podría explicar la menor reactividad de las plaquetas SBS a este agonista. Además de este complejo, las plaquetas humanas poseen otros receptores de trombina (PAR1 y PAR 4, "Protease Activator Receptors") pertenecientes a la familia de receptores de siete dominios transmembrana que se activan por proteolisis, y transmiten las señales de activación mediante acoplamiento a distintas proteínas G. PAR1 es un mediador clave de la agregación y activación de las plaquetas, así como iniciador de la cascada de la coagulación, ampliamente expresado en las plaquetas y otras células, así como también PAR4. La trombina, una serino proteasa y el mayor agonista de PAR1, escinde su extremo amino terminal, de manera tal que expone un ligando que autoactiva al receptor. El hexapéptido SFLLRN-NH2 incluido en el nuevo extremo amino terminal se denomina péptido activador del receptor de trombina (TRAP, "Thrombin Receptor Activating Peptide"). Hasta la fecha, no se han descrito patologías plaquetarias relacionadas con alteraciones específicas en estos receptores.

b) Defectos en otros elementos intraplaquetarios implicados en la activación: proteínas G, enzimas efectoras, segundos mensajeros, fosforilación de proteínas

Las proteínas G son un grupo heterogéneo de proteínas heterotriméricas, $\alpha\beta\gamma$, que actúan como nexo de unión entre receptores de membrana y las enzimas efectoras intracelulares. Los receptores acoplados a proteína G representan la familia más grande y diversa de receptores celulares en eucariotes, los cuales basan su interacción con proteínas G para transmitir señales a efectores unidos a la membrana, incluyendo canales iónicos y enzimas. Los receptores activos promueven el intercambio del GDP unido a la subunidad $G\alpha$ no activa por GTP, y la disociación de $G\alpha$ de las subunidades $G\beta\gamma$, lo que provoca su activación. Posteriormente, la actividad de GTPasa de $G\alpha$ y la participación de proteínas reguladoras extrínsecas, favorece la hidrólisis del GTP a GDP y la subsiguiente desactivación de $G\alpha$ y su reasociación con $G\beta\gamma$ hasta el siguiente ciclo de activación del receptor. Debido a su papel modulador en el proceso de la activación, las proteínas G son una importante causa potencial de defectos constitucio-

nales de la función plaquetaria. Este es el caso de una paciente con trastorno hemorrágico leve, caracterizado por alteraciones en la agregación, la secreción, la liberación de ácido araquidónico, y la movilización del calcio en respuesta a diversos agonistas. En esta paciente, se ha demostrado la asociación de estas alteraciones con una deficiencia cuantitativa hereditaria (menos del 50%) de la proteína Gαq. Los niveles de otras proteínas G (Gαi, Gα12, Gα13) son normales en esta paciente, resaltando la especificidad de la anomalía. Un fenotipo similar de función plaquetaria ha sido encontrado en ratones deficientes de Gαq.

Los sistemas enzimáticos efectores (fosfolipasas, nucleótido ciclasas), son otro importante eslabón en la cadena reguladora de la activación plaquetaria, al ser los generadores de los segundos mensajeros que promueven o inhiben ese proceso de activación. La fosfolipasa C, particularmente la isoforma β, es responsable de la rápida hidrólisis de fosfoinositoles que ocurre durante la activación inducida por la unión de muchos ligandos a sus receptores. Como consecuencia, se genera diacilglicerol (DAG), e inositol 1,4,5- trifosfato (IP_3), y se moviliza el calcio de los depósitos intracelulares. Existe en la literatura mención a varios pacientes con defectos de agregación y secreción asociados con una aparente deficiencia en la movilización del calcio intraplaquetario tras la activación con varios agonistas. Estudios específicos en dos de estos pacientes mostraron un defecto en la síntesis de DAG e IP_3 y en la fosforilación de la pleckstrina tras la activación con agonistas. Por el contrario, se podía inducir activación directa de la PKC con DiC8, y la subsiguiente secreción y fosforilación de proteínas. En uno de los pacientes se ha demostrado que una disminución selectiva de la fosfolipasa C-β2 es muy probablemente la causa de la alteración funcional. En línea con este hallazgo, estudios han demostrado que los neutrófilos de ratones deficientes en fosfolipasa C-β2 manifiestan una disminución en la acumulación de inositol fosfato, niveles de calcio intracelular.

En los últimos años, varios autores han identificado pacientes con fenotipo de sangrado moderado y un patrón de agregación y secreción plaquetaria alteradas, en los que se sospecha una alteración en las vías de hidrólisis de los fosfoinositoles y/o de la fosforilación de proteínas tras la activación con agonistas. En algunos de estos pacientes se ha demostrado con ensayos específicos una disminución significativa de la capacidad de síntesis de IP_3, de la movilización de calcio, o de la fosforilación de proteínas como pleckstrina. Sin embargo, la localización precisa de la alteración en la cascada de componentes de la transmisión de señales de activación está por establecerse.

La activación del complejo GPIIb-IIIa, necesaria para la unión de fibrinógeno y la posterior agregación plaquetaria es un proceso que conlleva la transmisión de señales de activación de dentro hacia fuera. Los elementos implicados en este proceso no han sido esclarecidos completamente, aunque hay evidencias de una participación muy relevante de la activación de la PKC y la fosforilación de la pleckstrina. Fallos en la transmisión de las señales conducentes a la activación del complejo IIb-IIIa parecen ser la causa de los fenotipos hemorrágicos y de función plaquetaria parecidos a la TG que muestran algunos pacientes con

niveles normales de complejos IIb-IIIa no mutados. Se sospecha actualmente que este tipo de defecto a nivel de la activación del complejo IIb-IIIa, cuya localización precisa no se ha identificado y puede ser heterogénea, puede ser el mecanismo común de los fallos de agregación, esencialmente en la primera onda, que muestran muchos pacientes.

c) Defectos en el metabolismo del ácido araquidónico y/o en la producción de tromboxano A_2

La liberación de ácido araquidónico desde los fosfolípidos de la membrana y su oxigenación a tromboxano A_2, es uno de los procesos clave de la activación plaquetaria. El tromboxano A_2 es un autacoide producido a partir del ácido araquidónico por acción de la ciclooxigenasa-1 (COX-1) y por la tromboxano A_2 sintasa e inicia la trombogénesis. Una vez liberado, es un potente agonista que incrementa la activación plaquetaria a través de su unión a un receptor propio de siete dominios transmembrana acoplado a proteínas G. La alteración hereditaria de cualquiera de estos sistemas enzimáticos puede dar lugar a una disminuida capacidad de síntesis de tromboxano A_2, y consiguientemente a una disfunción plaquetaria similar a la causada por el tratamiento con aspirina, que acetila en forma irreversible la COX-1. El patrón general de agregación muestra una disminución de la respuesta al ADP, colágeno o epinefrina, con una llamativa pérdida de la segunda onda de agregación.

Se han descrito varios pacientes con anomalías en la fosfolipasa A_2, que muestran este patrón de agregación anormal, pero con agregación normal en respuesta a ácido araquidónico. La identidad de este fallo no se ha aclarado en todos los casos y puede ser heterogénea. En otros casos con patrones de respuestas similares, no se confirma anomalías intrínsecas de esta enzima, y el fallo parece secundario a la movilización de calcio alterada tras activación por agonistas, con una deficiente activación de la fosfolipasa A_2. Deficiencias cuantitativas o cualitativas de ciclooxigenasa o de tromboxano sintetasa, han sido identificadas en varios pacientes. En estos casos, la respuesta de agregación al ácido araquidónico es muy deficiente. A falta de otras técnicas más específicas de identificación de estas enzimas, ambas trombocitopatías pueden distinguirse por la respuesta de agregación a la prostaglandina H2, que es normal en el caso del déficit de ciclooxigenasa y anormal si la deficiencia es de la enzima tromboxano sintetasa. Una respuesta normal a los análogos sintéticos del tromboxano A_2, ayuda a discernir estos cuadros de las patologías que afectan al receptor del tromboxano o a su mecanismo de transmisión de señales.

2.1.6. Alteraciones congénitas de la actividad procoagulante de las plaquetas

Cuando las plaquetas se activan se produce la externalización de fosfolípidos de carga negativa, en especial la fosfatidilserina. Este proceso contribuye en la función hemostática, ya que estos fosfolípidos de carga negativa soportan el ensamblaje de los complejos procoagulantes tenasa (VIIIa-IXa), que activa el factor X, y protrombinasa (Va-Xa), que activa el factor II o protrombina. La con-

secuencia final es la generación local de trombina, y subsiguientemente de la fibrina que estabiliza el trombo sobre la zona de lesión vascular. Clásicamente, la contribución de las plaquetas al proceso de la coagulación se ha definido como actividad factor 3 plaquetario. Se ha identificado una patología congénita denominada Síndrome de Scott, causada por una deficiencia congénita autosómica recesiva, caracterizada por un déficit aislado en la actividad procoagulante de las plaquetas, provocada por una menor exposición de fosfatidilserina, lo cual podría deberse a un defecto en alguna de las enzimas responsables de la externalización de fosfatidilserina, como la fosfatidiltranslocasa. En los pacientes afectados de este síndrome, la capacidad de ensamblaje del complejo protrombinasa, y con ello de formar trombos estables está disminuida, lo que favorece una sintomatología hemorrágica que incluye el sangrado excesivo tras extracciones dentarias, traumatismos, o cirugía, epistaxis y hematomas. La presencia de un tiempo de sangría normal, un tiempo de protrombina prolongado, altos niveles residuales de protrombina en plasma y la ausencia de un patrón de sangrado mayoritariamente mucocutáneo, permiten diferenciar los defectos congénitos de la actividad procoagulante de otros desórdenes plaquetarios cualitativos, aunque un diagnóstico definitivo requiere medición de fosfatidilserina expuesta en las plaquetas mediante citometría de flujo. El tratamiento de los pacientes con este tipo de patología se ha basado mayoritariamente en la transfusión de plaquetas. Un paciente ha sido tratado de manera eficaz con concentrados de complejo protrombínico, sin embargo, estos fármacos pueden inducir trombosis por lo que su utilización, si procede, se ha de restringir a episodios de sangrando severo. Hasta la fecha solo se han descrito 6 pacientes con Síndrome de Scott, aunque puede encontrarse subdiagnosticado debido a su presentación clínica relativamente leve hasta un significativo desafío hemostático.

Además del síndrome de Scott, se han descrito otras condiciones clínicas asociadas a una anormal actividad procoagulante de las plaquetas. Tal es el caso del síndrome de Stormorken, de herencia autosómica dominante, caracterizado por la sobreexpresión de actividad procoagulante en las plaquetas incluso en ausencia de agentes estimuladores, por lo que se conoce también como anomalía inversa al síndrome de Scott. Estos pacientes presentan un estado procoagulante activado sin estimulación previa, lo cual es caracterizado por la exposición de fosfatidilserina en la membrana, por lo cual este fenómeno se refleja también en la detección, mediante citometría de flujo, de una unión aumentada de anexina V a las plaquetas no estimuladas, y en la presencia en el plasma rico en plaquetas de los pacientes afectados de una concentración anormalmente alta de microvesículas. Además, la superficie de las plaquetas no estimuladas de estos pacientes tiene aumentados niveles de CD63 y de P-selectina, los cuales son marcadores de activación plaquetaria. Paradójicamente, la existencia en estos pacientes de unas plaquetas en permanente estado procoagulante no se traduce en una predisposición a la trombosis, sino que se manifiesta clínicamente con tendencia moderada al sangrado. Este fenotipo clínico concuerda con la observación en cámara de perfusión sobre colágeno, flujo a 650-2600 s^{-1}, de una menor capacidad de formación de trombos a pesar de una adhesión plaquetaria normal. A diferencia del síndrome de Scott, la alteración de Stormorken

parece ser multifactorial, e incluye, además de la alteración de la capacidad procoagulante, otras anomalías como asplenia, supervivencia plaquetaria reducida, miosis, dislexia, fatiga muscular e histiocitosis.

2.1.7. Otras trombocitopatías

Además de las alteraciones mencionadas anteriormente, se han identificado pacientes que manifiestan anormalidades de la función plaquetaria de difícil inclusión en los grupos anteriores, y que en ocasiones parecen también ligadas a desórdenes sistémicos.

Este es el caso del síndrome de Wiskott-Aldrich, mencionado brevemente en la sección de déficit de gránulos densos. Se trata de un trastorno hereditario raro, su incidencia es de 1 - 10 casos por millón de hombres nacidos vivos, ligado al cromosoma X que afecta a las plaquetas y además a los linfocitos T. Clínicamente se caracteriza por la presencia de trombocitopenia, volumen plaquetario reducido, inmunodeficiencia, infecciones severas recurrentes, aumentado riesgo de manifestaciones autoinmunes, malignidades y eczema. El gen responsable de este síndrome se identificó en 1994, compuesto por 12 exones, ubicado en el brazo corto del cromosoma X: Xp11.23 – Xp11.22. La severidad de la enfermedad es variable incluso entre individuos de una misma familia, pero se puede clasificar como un trastorno severo. Las plaquetas, de pequeño tamaño, muestran varias anormalidades, la más llamativa es un déficit severo del "pool" de nucleótidos de adenina, que impide el normal "feedback" positivo durante la activación y la agregación plaquetaria. También se ha descrito un defecto en el metabolismo energético de las plaquetas. El tiempo de sangría suele ser prolongado, más allá de lo esperable considerando la intensidad de la trombocitopenia. La esplenectomía suele corregir, al menos temporalmente, la trombocitopenia y el defecto en el tamaño plaquetario, y tiene un efecto positivo sobre la función plaquetaria. Siendo una opción válida de tratamiento, sobre todo en aquellos pacientes con sangrado intenso, se ha de considerar el mayor riesgo de infecciones postquirúrgicas en estos pacientes. El sangrado activo se trata con transfusiones de plaquetas irradiadas, y preferiblemente de donantes CMV negativos. Finalmente, el trasplante de médula ósea antes del inicio de una inmunodeficiencia intensa, puede curar el trastorno y es recomendable si se dispone de un donante histocompatible. En pacientes jóvenes puede ser válido el trasplante de donantes compatibles no relacionados y/o de células de cordón umbilical. En algunos pacientes la alteración molecular responsable de esta enfermedad se ha localizado en el gen que codifica la llamada proteína del síndrome de Wiskott-Aldrich, una molécula que actúa como regulador clave del ensamblaje del citoesqueleto plaquetario, donde interacciona con otras proteínas específicas de la transmisión de señales de activación como la GTPasa Cdc42 o proteínas adaptadoras de la familia Src como p47nck. Otros pacientes con el síndrome de Wiskott-Aldrich no muestran mutaciones en el gen de esa proteína, lo que indica la implicación de otros genes en la patogénesis de la enfermedad. En algunos pacientes, se han detectado alteraciones a nivel de la GPs adhesivas de la membrana plaquetaria como CD43 o sialoforina, GPIb, GPIa, GPIIb-IIIa, o GPIV.

Además del síndrome de Wiskott-Aldrich, se han descrito alteraciones de la estructura y/o función de las plaquetas en asociación con otros desórdenes sistémicos como el síndrome de Down, y algunas macrotrombocitopenias constitucionales. Estas últimas son un conjunto de síndromes, de herencia autosómica dominante, que cursan con trombocitopenia, plaquetas de gran tamaño, escasa diátesis hemorrágica y ausencia de alteraciones valorables en los estudios funcionales. La reciente identificación de una misma anomalía genética en las macrotrombocitopenias asociadas a inclusiones ribosómicas en los leucocitos y/o a síndromes Alport-like (nefropatía e hipoacusia), indica que forman un grupo de síndromes relacionados (síndrome de May-Hegglin, síndrome de Sebastian, síndrome de Epstein y síndrome de Fechtner). La detección de macrotrombocitopenia en pacientes con microdeleción del cromosoma 22q11 y síndrome velocardiofacial determina un segundo grupo de macrotrombocitopenias. Finalmente, quedarían las macrotrombocitopenias no asociadas a inclusiones leucocitarias ni a otras anomalías, de etiopatogenia desconocida. En estos casos, no se han identificado aún los mecanismos aberrantes responsables de las anomalías plaquetarias.

3. TROMBOCITOPATÍAS ADQUIRIDAS

La anomalía funcional plaquetaria ocurre en numerosas condiciones clínicas adquiridas. Destacamos aquí las patologías más frecuentes de este tipo, y que son clínicamente relevantes, pues muchas alteraciones funcionales no tienen una correlación clínica evidente o demostrada y se expresan solo como hallazgos de laboratorio. La tabla 34-5 muestra una clasificación general de los defectos plaquetarios adquiridos.

Tabla 34-5. Anomalías funcionales adquiridas de las plaquetas

Asociadas a enfermedades sistémicas
Uremia
Insuficiencia hepática
Anticuerpos antiplaquetarios
Cirugía con circulación extracorpórea
Leucemias y mielodisplasias
Disproteinemias
Por drogas, alimentos, especies y vitaminas

3.1. Asociadas a enfermedades sistémicas

3.1.1. Trombocitopatía urémica

La insuficiencia renal crónica (IRC) evoluciona con una alteración compleja de la hemostasia, en que clínicamente coexisten los riesgos de hemorragia y trombosis. Ya en 1827 Richard Bright destacaba la alta frecuencia de hemorragia purpúrica en pacientes con IRC. De hecho, la progresión natural de la enfermedad lleva a la hemorragia, determinante mayor de mortalidad hasta el advenimiento de la hemodiálisis. En 1974, a pocos años de introducido ese tratamiento de

diálisis, Lindner y colaboradores, advertían respecto al acelerado desarrollo de arteriosclerosis y de su complicación trombótica como causa de muerte en sus pacientes. Este viraje en el enfoque del problema hemostático se confirma al constatar la menor frecuencia de publicaciones recientes sobre la patogenia de la hemorragia en IRC en comparación con el creciente interés en aclarar los mecanismos de la aterosclerosis y trombosis asociada al síndrome urémico, principal causa de muerte en pacientes en diálisis crónica.

Patogenia. El agravamiento metabólico producido durante el curso natural de la IRC no modificada por la diálisis conduce en forma inexorable a la hemorragia. Existe un defecto de hemostasia primaria, comprometiendo los fenómenos dependientes de la interacción plaqueta-endotelio y que clínicamente se manifiesta por hemorragias cutáneas y mucosas. La tabla 34-6 resume las alteraciones descritas en los distintos componentes del sistema de hemostasia primaria que explican la tendencia hemorrágica. Dejando de lado algunas discrepancias entre las diversas publicaciones, la observación de la tabla indica que existiría anomalía en casi todas las etapas del proceso de hemostasia primaria. De hecho, en los últimos 25 años se ha podido anticipar que cada nuevo avance en el conocimiento de los mecanismos de disfunción plaquetaria, de alteraciones del FVW y de la patología vascular iba seguido de cerca por la descripción de similar alteración en los pacientes con IRC.

Tabla 34-6. Patogenia del defecto hemorrágico en la uremia

Alteraciones de la función plaquetaria
- Defecto de agregación de las plaquetas
- Defecto de secreción de las plaquetas
- Aumento de actividad de adenilil ciclasa, de cAMP y cGMP plaquetarios
- Disminución de ADP, ATP y 5-HT granulares
- Defecto en la liberación de calcio intraplaquetario
- Defecto en metabolismo del araquidonato, con síntesis disminuida de TxA_2
- Defecto de GPs Ib y IIb-IIIa de membrana plaquetaria
Disminución de la concentración de plaquetas o de la masa plaquetaria total
Defectos cualitativos y/o cuantitativos del factor von Willebrand
Alteración de la relación plaquetas-pared vascular
- Defecto de adhesividad plaquetaria al subendotelio
- Aumento de la producción de prostaciclina
- Aumento de la producción de óxido nítrico, inducido por ácido guanidino succínico
Activación sistémica de la coagulación
Activación de la fibrinolisis sistémica
Contribución de la anemia

La mayoría de los estudios sobre el defecto hemostático en la uremia han abordado aisladamente la patogenia de la hemorragia y la aterotrombosis, asumiendo implícitamente que son procesos independientes. Sin embargo, está bien documentado que la IRC cursa con un proceso inflamatorio sistémico, con aumento de citoquinas inflamatorias, reacción de fase aguda, disfunción endotelial y activación del sistema de la coagulación y de la fibrinolisis, todos procesos presentes desde fases tempranas de la enfermedad. El conjunto de estos procesos determina un perfil de laboratorio muy similar al de la CID crónica, subclínica, en que la progresión de estos procesos y el balance entre ellos puede determinar la tendencia clínica: hemorragia o trombosis. Estos procesos ocurren durante el curso natural de la enfermedad, en ausencia de tratamiento dialítico.

El defecto de hemostasia primaria se pesquisa por prolongación del TS presente en más de 50% de los pacientes con IRC (creatinina sérica promedio de 11 mg/dL) antes de ingresar a programas de hemodiálisis. Siendo el único método disponible para detectar fallas de hemostasia primaria in vivo, el TS se ha usado como indicador de riesgo de hemorragia. Sin embargo, la información disponible es aún insuficiente para afirmar que dicha prueba sea un buen predictor de hemorragia. De hecho, la hemorragia clínica es infrecuente en pacientes con IRC en etapa pre-dialítica, aún con TS anormalmente prolongado. Sin embargo, los pacientes pueden presentar hemorragias graves, particularmente en relación a cirugía, trauma o lesiones anatómicas del tubo digestivo. La diálisis, extracorpórea o peritoneal, compensa metabólicamente a los pacientes, impidiendo que la incidencia de hemorragias aumente notoriamente con la progresión de la enfermedad. Al contrario, como se indicó antes, la IRC en sus etapas avanzadas en diálisis se asocia más a complicaciones aterotrombóticas.

El TS se correlaciona en forma directa con creatinina sérica, disfunción plaquetaria, reducción del ATP intraplaquetario e intensidad de la anemia. Entre estos, sin embargo, los únicos determinantes independientes del TS son la creatinina sérica y el defecto funcional plaquetario. Es poco probable que cada uno de los defectos tenga una patogenia independiente del resto y sí es factible que la mayoría de ellos estén encadenados en una cascada patogénica jerarquizada, con factores causales anteriores, capaces de desencadenar el desequibrio hemostático. Tradicionalmente se ha atribuido el defecto hemostático a una alteración funcional plaquetaria, y se han comunicado alteraciones de adhesión, agregación, secreción y actividad procoagulante plaquetarias. Sustancias ajenas a las plaquetas, presentes en el plasma urémico (“toxinas urémicas”), parecen ser relevantes en la patogenia de estos defectos. Ello explicaría que la transfusión de plaquetas sea generalmente inefectiva en el manejo de la hemorragia y en la corrección del TS en la uremia. Entre las posibles toxinas urémicas, el ácido guanidinosuccínico, se ha descrito recientemente como inductor de la síntesis de NO por plaquetas y endotelio, lo que podría explicar disminución de la respuesta plaquetaria a agonistas, el defecto de adhesión y la prolongación del TS. En esta línea, se ha observado que el TS se acorta con la administración de monometil-L-arginina, inhibidor de la producción de óxido nítrico (NO), en voluntarios sanos. Por otro lado, la activación de la coagulación (con aumento de

la generación intravascular de trombina) y de la fibrinolisis (con aumento de la producción de plasmina), relacionadas al proceso inflamatorio urémico, podrían dar cuenta de los defectos granulares y de GPs de membrana, que contribuyen en la disfunción plaquetaria.

Los pacientes con IRC, ya antes de ingresar a programas de diálisis, tienen aumento de proteínas de fase aguda en el plasma, por ej., fibrinógeno, proteína C reactiva, α-1 antitripsina. Asimismo, la concentración de FVW, proteína sensible a la inflamación, está generalmente aumentada en el plasma; este aumento se acompaña de una actividad comúnmente normal de su función, medida como cofactor ristocetina. La distribución multimérica del FVW es también normal. La disociación entre concentración antigénica y función del FVW, con aumento del primero, compensaría la relativa deficiencia funcional, por lo que se estima que las alteraciones del FVW no tienen participación mayor en la patogenia del defecto de adhesividad plaquetaria.

La anemia de la IRC se relaciona a la prolongación del TS y, en estudios ex vivo, con el defecto de adhesividad plaquetaria. La corrección de la anemia mejora parcialmente el defecto de hemostasia primaria. Este mecanismo no es exclusivo de la IRC y se presenta en anemias de otras etiologías, pero debe tenerse en cuenta en el tratamiento y prevención de hemorragias en los pacientes urémicos.

El consumo de drogas que inhiben la función plaquetaria potencia el defecto de hemostasia primaria aumentando el riesgo de hemorragia. Algunos pacientes presentan, además, trombocitopenia; esta, que habitualmente es leve, puede orientar respecto a la etiología de la IRC, pero si el conteo es superior a 100.000 plaquetas/μL, el hallazgo tiene baja incidencia en la manifestación hemorrágica.

Tratamiento. Diversas terapias se han propuesto para prevenir o tratar la hemorragia urémica (tabla 34-7). El ingreso de los pacientes a programas de diálisis detiene la progresión del deterioro metabólico y disminuye notoriamente la incidencia de hemorragias en relación a la era pre-dialítica. No existe consenso respecto al mecanismo de esta mejoría, y específicamente hay controversia si la diálisis mejora o empeora la función plaquetaria *ex vivo*.

Tabla 34-7. Tratamiento del defecto hemorrágico en la uremia

Hemodiálisis o peritoneodiálisis
Corrección de la anemia: transfusión de eritrocitos o administración de eritropoyetina
Transfusión de crioprecipitados
Desmopresina
Estrógenos conjugados
Inhibidores de NO sintetasa
Ácido tranexámico

La corrección del hematocrito a niveles sobre 30%, por transfusión de eritrocitos o por tratamiento con eritropoyetina recombinante, acorta el TS y parece disminuir las hemorragias en la IRC. Algunos autores reportan también una mejoría de la adhesión y agregación plaquetarias inducidas por eritropoyetina, independiente del alza de hematocrito.

La transfusión de crioprecipitados se usó inicialmente en forma empírica, observándose un acortamiento transitorio del TS que facilita la realización de procedimientos quirúrgicos o invasivos en pacientes con IRC. Su mecanismo de acción permanece aún desconocido, aunque se asoció al aumento en el plasma de la concentración de componentes del complejo FvW/FVIII. El uso de crioprecipitados se ha discontinuado por los riesgos inherentes a su transfusión, por el desconocimiento de su mecanismo de acción y porque su eficacia no ha sido confirmada. En la actualidad su uso se ha reemplazado por la 1-deamino-8-D-arginina vasopresina (desmopresina), un análogo de la hormona antidiurética sin efecto vasopresor, y que constituye uno de los pilares en el tratamiento o prevención de la hemorragia urémica. En dosis de 0.3 mg/kg, diluido en 50-100 mL de solución salina y con infusión endovenosa lenta (30-45 minutos), acorta el TS en una proporción variable de pacientes urémicos (hasta 75%). El efecto sobre el TS es transitorio, (alrededor de 4 horas), asociado a aumento de FVIII:c, FVW:Ag y FVW:RCo y aparición en la circulación de multímeros de alto peso molecular. Por otro lado, en pacientes urémicos con niveles muy elevados de componentes del complejo FVW/FVIII, algunos investigadores no han observado acortamiento del TS después de la administración de desmopresina. Mecanismos distintos a cambios cualitativos o cuantitativos del complejo FVW/FVIII pueden estar involucrados en el efecto benéfico de la desmopresina, ya que, como se discutió antes, no existe evidencia aún de que alteraciones de este complejo participen en la patogenia de la hemorragia urémica. Los efectos adversos asociados a la administración de esta droga incluyen taquicardia, enrojecimiento facial, retención de agua e hiponatremia, aunque estos últimos dos efectos no se presentan en pacientes con deterioro grave de la función renal.

El uso de estrógenos conjugados, en dosis de 0.6 mg/kg/día durante 5 días induce un acortamiento del TS, detectable entre los días 5 y 7, y que se prolonga hasta 2 semanas. Esta terapia no es efectiva si se requiere una inmediata mejoría del TS, pero es la única que produce un acortamiento prolongado del TS cuando se busca un efecto hemostático duradero. El mecanismo de acción de los estrógenos se explicaría por su capacidad de reducir la expresión de NO sintetasas y, consecuentemente, limitar la síntesis de NO endotelial y plaquetario en la uremia, mecanismo postulado para explicar la anormalidad del TS. En efecto, se ha comunicado que la inhibición de la síntesis de NO en voluntarios sanos mediante administración experimental de monometil-L-arginina acorta el TS, pero esta aproximación terapéutica no ha sido probada en pacientes con IRC.

El ácido tranexámico, en dosis orales de 20-25 mg/kg/día durante 6 días acorta el TS en 67% de los pacientes con IRC avanzada antes de ingresar a programas de diálisis. Este efecto ya se evidencia en algunos enfermos después de 1-2 días

de tratamiento. El ácido tranexámico mejora también la agregación y secreción plaquetarias ex vivo. Esta sustancia desplaza al plasminógeno de la superficie de la fibrina, pues ocupa los sitios de unión a lisina del plasminógeno, inhibiendo su unión a residuos de lisina en la malla de fibrina. En la IRC, el efecto del ácido tranexámico sobre las variables de hemostasia primaria parece mediado por inhibición de la actividad, no de la generación, de plasmina, pues se asocia a normalización de los niveles plasmáticos de productos de degradación de fibrinógeno/fibrina, pero sin reducción de los complejos plasmina-antiplasmina en la circulación. Simultáneamente, se observa una caída de la concentración de plasminógeno, probablemente por depuración acelerada de los complejos plasminógeno-ácido tranexámico. Estas observaciones sugieren que la fibrinolisis juega un papel importante en la patogenia del defecto de hemostasia primaria en la uremia.

3.1.2. Anomalía funcional de las plaquetas en insuficiencia hepática

Patogenia. El riesgo de sangrado en pacientes con insuficiencia hepática crónica es alto. Además de la hipertensión portal (várices esofágicas, hemorroides, gastritis) que precipita la hemorragia, con frecuencia se observa esplenomegalia con hiperesplenismo y leve trombocitopenia, activación intravascular de los sistemas de la coagulación y fibrinolisis, los pacientes más enfermos presentan niveles disminuidos de fibrinógeno, coagulación intravascular diseminada subclínica, además de prolongación en el tiempo de protrombina (TP) y tromboplastina parcial activada (TTPA). Alrededor de 40% de los pacientes con cirrosis hepática presentan TS prolongado, relacionado a la gravedad del daño hepático, medido por aumento de bilirrubina sérica. Esta alteración de hemostasia primaria debiera ser considerada durante la evaluación de pacientes para procedimientos invasivos o cirugía. La prolongación del TS podría explicarse por defectos en la adhesión y agregación plaquetaria, también descritos en cirrosis hepática de diversas patogenias. El defecto funcional se ha confirmado utilizando un analizador de función plaquetaria, denominado PFA-100, y que detecta bien el efecto de la anemia en la disfunción hemostática.

Se han propuesto varias causas para explicar los defectos plaquetarios. La situación de proteolisis aumentada, a través de plasmina, trombina u otras proteasas, podría inducir una activación intravascular de las plaquetas. En efecto, a plasmina y otras proteasas se les ha atribuido la reducción de actividad cofactor ristocetina del FVW circulante en esta enfermedad. Disminución del contenido de ácido araquidónico en la membrana, aumento de productos de degradación de fibrinógeno-fibrina y síntesis de fibrinógeno cualitativamente anormal podrían contribuir también al defecto de agregación plaquetaria descrito. En estos pacientes se ha comunicado que 64% con enfermedad hepática crónica de diferente etiología presentan autoanticuerpos plaquetarios, dirigidos contra GPs Ib, IIb-IIIa o ambas, hallazgo que no está relacionado al recuento de plaquetas en sangre o a la etiología de enfermedad hepática. Estas observaciones podrían contribuir al defecto de agregación y reducción cuantitativa de GPIb en la cirrosis hepática. La progresión de esta enfermedad se asocia con aumento de la producción de óxido nítrico. Este aumento se ha demostrado específicamente

en neutrófilos y monocitos de pacientes cirróticos, que al ser coincubados con plaquetas inducen un mayor aumento de cGMP y mayor inhibición de la agregación que la observada con neutrófilos y monocitos obtenidos de sujetos control.

Tratamiento. Para manejar el riesgo hemorrágico en pacientes con cirrosis se ha empleado desmopresina, que administrada en forma intravenosa o subcutánea acorta el TS. No se ha demostrado que la transfusión de concentrados plaquetarios sea de utilidad para acortar el TS o mejorar la función plaquetaria en esta enfermedad, pero debe ser utilizado en casos de sangrado continuo, también es importante considerar el uso de antifibrinolíticos. Incluso, la recuperación post-transfusional de plaquetas en pacientes con hiperesplenismo está disminuida en proporción inversa al tamaño del bazo.

3.1.3. Alteraciones plaquetarias inducidas por la cirugía con circulación extracorpórea

Patogenia. La cirugía con circulación extracorpórea (CEC) se complica de hemorragias en 5%-10% de los pacientes, frecuencia bastante mayor que la cirugía común. Aunque en más de 50% de los casos esta complicación es de causa quirúrgica, el resto responde a una alteración del sistema hemostático. Descontando el hecho de que una proporción de pacientes llega a la cirugía usando drogas antiplaquetarias, la patogenia del trastorno hemostático es multifactorial: heparinización del paciente, disminución de la concentración de plaquetas y factores de la coagulación por hemodilución y consumo, activación de la fibrinolisis, contacto de la sangre con superficies no biológicas, hipotermia, traumatismo celular, interfase gas-sangre, perturbaciones reológicas. Sin embargo, la más significativa de las alteraciones es la disfunción plaquetaria asociada a la CEC, un factor causal mayor de hemorragia, y presente tanto con el uso de oxigenadores de burbuja como de membrana. Los potenciales factores adversos presentes durante la CEC que explicarían las alteraciones cuantitativas y funcionales de las plaquetas actúan a través de activación plaquetaria, fragmentación celular y daño de membrana: (a) La activación plaquetaria puede ser causada por varios factores: adhesión y agregación de las plaquetas a fibrinógeno adsorbido en superficies del circuito extracorpóreo, trauma mecánico, exposición de las plaquetas a trazas de trombina, plasmina, ADP o proteasas derivadas de activación del complemento, hipotermia o, en el caso de los oxigenadores de burbuja, a la interfase aire-sangre; (b) La fragmentación celular, inducida por el traumatismo físico, la activación de las plaquetas o la activación del complemento, produce micropartículas plaquetarias que circulan y exponen fosfolípidos procoagulantes; (c) El daño de membrana se expresa en reducción del número de receptores de fibrinógeno, de GPIb, o de receptores α_2 adrenérgicos. Todas estas noxas se traducen en prolongación del TS, reducción de la agregación y secreción plaquetarias *ex vivo*, reducción de la aglutinación plaquetaria con ristocetina, deficiencia del compartimiento de depósito por liberación de contenidos de gránulos densos y alfa y aparición de micropartículas plaquetarias en la circulación.

En general, la intensidad de las alteraciones plaquetarias está relacionada a la duración de la CEC y ellas revierten espontáneamente varias horas después de termi-

nada la cirugía. Dicha reversibilidad es un factor importante a considerar cuando se evalúa reintervenciones quirúrgicas en pacientes con hemorragias a través de drenajes, pues el tiempo juega a favor de la resolución espontánea de la complicación.

Tratamiento. No está demostrado que la realización de TS preoperatorio identifique a los pacientes con tendencia a sangrar más durante la cirugía con CEC y sin historia clínica previa de hemorragias anormales. La transfusión profiláctica de plaquetas para prevenir una excesiva hemorragia quirúrgica no es una buena indicación en el paciente habitual, pero la transfusión debe estar fácilmente accesible en enfermos con reintervenciones o con cirugías prolongadas. La complicación hemorrágica se controla habitualmente bien mediante la transfusión de plaquetas. Estos pacientes también pueden responder a la infusión de DDAVP. Si la hemorragia no es controlada con estas medidas, generalmente se considera la reexploración quirúrgica para identificar el sitio dominante de la hemorragia.

En los últimos años se ha propiciado el uso de aprotinina, un inhibidor de serino proteasas que ha sido utilizado clínicamente para prevenir la pérdida de sangre en cirugías mayores, incluyendo cirugía cardíaca y trasplante de hígado. El efecto de la aprotinina sería mediado por su acción anticoagulante, antifibrinolítica y antiinflamatoria, lo cual clínicamente es evidente por disminución de los niveles del dímero D, fragmento 1+2 de protrombina y bradiquinina. La aprotinina es un inhibidor directo de la plasmina, pero también inhibe la activación de la fibrinólisis dependiente de FXIIa al inhibir la kalicreína. No existe evidencia suficiente aún para afirmar que la droga reduce la activación plaquetaria inducida por plasmina y otras proteasas. La dosificación usual de aprotinina (280 mg en 20 minutos inmediatamente antes de la cirugía, 280 mg en la solución de cebado del circuito e infusión continua de 70 mg/hora durante la operación), se ha demostrado que reduce significativamente el sangrado en estos pacientes. El uso repetido de aprotinina puede complicarse con reacciones anafilácticas al péptido. Estudios recientes revelan que el ácido tranexámico, en dosis de 1g intravenoso en 20 minutos antes de la incisión quirúrgica, 500 mg en la solución de cebado e infusión continua de 400 mg/hora durante la operación, tiene un efecto similar a la aprotinina en el control del sangrado en pacientes con cirugía con CEC electiva. El costo del ácido tranexámico es significativamente menor que el de aprotinina, un aspecto muy importante a considerar cuando se decide la terapia en estos pacientes.

En general, se administra un bolo de heparina antes de la administración de la cánula de la membrana de circulación extracorpórea (ECMO), para así reducir el riesgo de coagulación del circuito y luego se inicia la infusión de heparina. Comparado con el ECMO tradicional, los circuitos unidos a heparina se asocian a una menor pérdida de sangre, menores reintervenciones, una mejor función plaquetaria y además una disminución en la activación de leucocitos y del complemento, lo cual da como resultado una estadía hospitalaria de menor tiempo, lo que además favorece al paciente.

3.1.4. Disfunción plaquetaria en leucemias, mielodisplasias y disproteinemias

Patogenia. Variadas alteraciones morfológicas y funcionales de las plaquetas se han descrito en enfermedades mieloproliferativas crónicas: alteraciones de

forma y tamaño, alteraciones de agregación y secreción en respuesta a agonistas habituales (ADP, epinefrina, colágeno), defecto de actividad procoagulante. Estas anomalías pueden originarse a nivel de receptores para algunos agonistas en la membrana plaquetaria, en la liberación y metabolización del ácido araquidónico, en la transducción de estímulos o en deficiencia de contenidos granulares. Alrededor de 30% de los pacientes pueden presentar hemorragias mucocutáneas en algún momento de su evolución. Paradójicamente, en este grupo de enfermedades, una proporción de enfermos puede también complicarse con trombosis arterial o venosa. No existen factores que anticipen el riesgo de hemorragia o trombosis en estos pacientes y las pruebas de laboratorio comúnmente usadas (TS, conteo de plaquetas, agregación y secreción plaquetaria in vitro), no sirven para predecir el riesgo de una u otra complicación.

Alteraciones similares a las anteriores se han descrito en leucemias agudas, síndromes mielodispásticos y leucemia por células vellosas. Sin embargo, es la trombocitopenia habitual de estas enfermedades la que condiciona mayormente el riesgo de hemorragia.

Anomalías de la función plaquetaria se observan también en pacientes con mieloma múltiple IgA, IgG, macroglobulinemia de Waldenström y, ocasionalmente en gammapatía monoclonal benigna. El TS puede estar prolongado, así como pueden observarse alteraciones de agregación y secreción plaquetarias, retracción del coágulo y limitación de la actividad procoagulante de las plaquetas. Los defectos plaquetarios son causados por la proteína monoclonal y están directamente relacionados a la concentración de la paraproteína, que puede adsorberse a la membrana plaquetaria. En efecto, la anomalía puede corregirse al normalizar la concentración de la proteína o puede reproducirse al incubar plaquetas normales con el plasma disproteinémico.

Debe tenerse claro que estas afecciones se asocian a otras causas de hemorragia, como síndrome de hiperviscosidad, trombocitopenia por compromiso medular, amiloidosis con deficiencia adquirida de factor X, activación de la fibrinolisis y alteraciones en la polimerización de la fibrina. En la mayoría de los casos, una o más de estas anomalías explican la hemorragia.

Tratamiento. La prevención y manejo de hemorragias están orientados al control de la enfermedad basal. Como las alteraciones son intrínsecas a las plaquetas, la transfusión de plaquetas es la terapia de elección, aunque de efecto transitorio.

3.2. Disfunciones plaquetarias inducidas por drogas y alimentos

El uso de drogas es la causa más frecuente de disfunción plaquetaria adquirida, y la lista de drogas reportadas con efecto antiplaquetario supera las 100. La importancia clínica de este efecto es variada: solo para escasas drogas que prolongan el TS existe evidencia inequívoca de asociación causal a hemorragias; otras se asocian a prolongación del TS, pero no se ha demostrado que su empleo cause sangrado patológico; en fin, otras pueden solamente afectar la función de las plaquetas ex vivo o in vitro. En relación a drogas involucradas en hemorragias, su efecto antiplaqueta-

rio no es habitualmente suficiente por sí para causar una hemorragia en individuos sanos, pero su combinación con otras condiciones que afectan la hemostasia (por ej., cirugía, infecciones, enfermedad de von Willebrand subyacente, tratamiento anticoagulante), exacerban el riesgo de sangrado patológico. Un listado con drogas asociadas a disfunción plaquetaria se presenta en la tabla 34-8.

Tabla 34-8. Drogas y otras sustancias que inhiben la función plaquetaria

Antiinflamatorios no esteroidales
Aspirina
Indometacina, naproxeno, ibuprofeno, diclofenaco, fenilbutazona, otros
Sustancias desarrolladas primariamente como drogas antiplaquetarias
Inhibidores del receptor de ADP: ticlopidina, clopidogrel
Antagonistas de GPIIb-IIIa: anticuerpos monoclonales (abciximab), péptidos cíclicos (eptifibatide), peptidomiméticos (tirofiban, lamifiban)
Antibióticos
β-lactámicos: penicilinas, cefalosporinas.
Otros: nitrofurantoínas, miconazole
Drogas que afectan la hemostasia: anticoagulantes, fibrinolíticos, antifibrinolíticos.
Heparina
Estreptoquinasa, activador tisular del plasminógeno, uroquinasa
Otros: sulfato de protamina, ácido ε-aminocaproico
Drogas que aumentan el cAMP y cGMP plaquetarios
Dipiridamole, prostaciclina y análogos
Nitroglicerina y símiles, nitroprusiato
Otras drogas usadas en enfermedades cardiovasculares
Diltiazem, nifedipino, nimodipino, verapamil, quinidina
Expansores de volumen
Dextrano, hidroxietil-almidón
Drogas psicotrópicas
Amitriptilina, imipramina, nortriptalina, clorpromazina, flufenazina, prometazina, trifluoperazina, haloperidol
Anestésicos
Locales: procaína, tetracaína, cocaína, butacaína, dibucaína, otras...
Generales: halotano
Drogas oncológicas
Daunorrubicina, mitramicina, BCNU, quimioterapia combinada, vincristina, otros
Antihistamínicos
Clorfenamina, difenilhidramina, otros.
Medios de contraste
Lopamidol, iotalamato, ioxalato, diatrizoato
Etanol
Alimentos, especies y vitaminas
Ácidos grasos omega-3, extracto de cebolla, de ajo, cúrcuma, comino, vitaminas E y C, otros.

(Tabla adaptada de George J.N. y Shattil S.J., N Engl J Med 1991; 324: 27-39).

Algunas drogas han sido específicamente diseñadas para interferir la función plaquetaria y ser usadas en la prevención o tratamiento de trombosis arteriales. Entre ellas, ticlopidina y clopidogrel, (dirigidas contra el receptor P2Y12 del ADP en plaquetas), y antagonistas de la GPIIb-IIIa (anticuerpos monoclonales, péptidos cíclicos y peptidomiméticos). Otros analgésicos antiinflamatorios, como la aspirina y el grupo de los antiinflamatorios no esteroideos, no diseñados originalmente como antitrombóticos, inhiben también la función plaquetaria. Aunque esta alteración se puede asociar a prolongación del TS, prueba que mide hemostasia primaria in vivo, una minoría de los pacientes presenta síntomas hemorrágicos derivados de su empleo.

a) Aspirina y antiinflamatorios no esteroideos

La aspirina (ácido acetilsalicílico) es la droga que acumula la evidencia más convincente de que su acción antiplaquetaria tiene relación con sangrado anormal. La aspirina acetila irreversiblemente la serina en posición 529 de la ciclooxigenasa plaquetaria, cerca del sitio catalítico de la enzima. El grupo acetilo obstruye el canal hidrofóbico de la enzima por donde el ácido araquidónico accede a su sitio activo, bloqueando así su metabolización a endoperóxidos cíclicos PGG2 y PGH2, y por ende, la síntesis de tromboxano A2. Esta inhibición ocurre por toda la vida de la plaqueta en la circulación. Por su parte, los antiinflamatorios no esteroideos, como el ibuprofeno, inhiben en forma competitiva, reversible, el sitio catalítico de la ciclooxigenasa, bloqueando la síntesis de tromboxano por algunas horas, mientras dura el efecto de la dosis administrada.

La aspirina y antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) prolongan el TS y bloquean la agregación y secreción plaquetarias, sin afectar la adhesividad. En individuos sanos la prolongación del TS causada por aspirina en dosis única tan baja como 80 mg/kg es modesta (1.2 a 2 veces el tiempo pre-droga). La prolongación del TS es significativamente mayor en individuos con defectos hemostáticos preexistentes, hereditarios o adquiridos, por ej., en individuos con hemofilia o enfermedad de von Willebrand o en pacientes urémicos. La anormalidad en la agregación plaquetaria inducida por aspirina puede durar hasta una semana, hasta que una suficiente proporción de plaquetas no afectadas reemplace en la circulación a las inhibidas por la droga. Idéntico efecto produce la aspirina sobre la ciclooxigenasa endotelial; sin embargo, este es de corta duración, presumiblemente por la capacidad de la célula endotelial de resintetizar ciclooxigenasa. En contraste con la aspirina, la prolongación del TS inducida por la mayoría de los AINEs es de corta duración, usualmente, 4-8 horas.

El significado clínico de la ingestión de aspirina sobre la hemostasia de individuos aparentemente sanos es poco claro. Si bien aumenta la frecuencia e intensidad de equímosis, epistaxis y pérdida de sangre por el tubo digestivo, estas manifestaciones son habitualmente de poca relevancia clínica. La gastritis hemorrágica ocasionalmente se asocia al uso de aspirina. Algunos estudios revelan aumento del sangrado quirúrgico, especialmente en cirugía con CEC, en pacientes bajo efecto de aspirina, pero otros no confirman estos hallazgos; en

todo caso, ellos no se acompañan de mayor morbilidad perioperatoria. Se recomienda, sin embargo, evitar el uso de aspirina en cirugías en que aun sangrados de baja magnitud son riesgosos, por ejemplo, neurocirugía, cirugía ocular. Debe tenerse en cuenta, además, que el etanol u otras drogas con efecto antiplaquetario pueden potenciar la inhibición inducida por aspirina.

b) Antibióticos β-lactámicos

Varios antibióticos que comparten un anillo β-lactámico prolongan el TS y alteran la agregación plaquetaria y la aglutinación inducida por ristocetina. Dicho efecto está relacionado a la dosis, aparentemente es reversible, y es muy frecuente en el ambiente clínico hospitalario. El efecto aparece 1-3 días después del inicio de la terapia y se observa especialmente en pacientes que reciben altas dosis de estos antibióticos. Sin embargo, el contexto clínico en que se observa el defecto, (enfermos graves y con otras alteraciones hemostáticas), impide atribuir las eventuales hemorragias a la disfunción plaquetaria.

c) Heparina y fibrinolíticos

La heparina no solo inhibe la generación y acción de trombina, sino también afecta la función plaquetaria. Esta acción parece estar mediada por la menor disponibilidad de trombina, por interacción de la heparina con receptores plaquetarios y por reducción de las funciones plaquetarias dependientes de FVW, posiblemente por unión de heparina a dominios específicos del FVW. Sin embargo, no existe evidencia directa que culpe a las plaquetas de contribuir a las hemorragias causadas por la terapia con heparina.

El uso en dosis farmacológicas de estreptoquinasa, activador tisular del plasminógeno (t-PA) y de uroquinasa se asocia a hemorragia. En su patogenia se reconoce efecto combinado de la hiperfibrinolisis y de lesiones de vasos sanguíneos. La generación intravascular de plasmina altera la función plaquetaria por varios mecanismos, observándose tanto efectos de activación in vivo, como inhibición de la función plaquetaria: esta puede explicarse por refractariedad posterior a su activación, por inhibición de la agregación inducida por las altas concentraciones de productos de degradación de fibrinógeno/fibrina, por degradación de GPIb y posiblemente de GPIIb-IIIa, y por desagregación de plaquetas mediada por efecto de plasmina sobre el fibrinógeno que está cohesionando las plaquetas en un agregado. En todo caso, no existe evidencia sólida que implique a estos defectos plaquetarios en la patogenia de las hemorragias observadas durante el tratamiento trombolítico. Sin embargo, además de la suspensión de las drogas fibrinolíticas y de la reposición de fibrinógeno, empíricamente se transfunde plaquetas para mejorar la hemostasia primaria en estos pacientes.

d) Drogas que aumentan la concentración de cAMP y cGMP en plaquetas

El aumento de cAMP en las plaquetas prolonga el TS e inhibe la activación plaquetaria. Dicho aumento es inducido por drogas que estimulan la adenilil ciclasa

(infusión de PGE1, prostaciclina y análogos estables) así como por drogas que inhiben la fosfodiesterasa plaquetaria (dipiridamol, cafeína, teofilina). Sin embargo, no existe evidencia inequívoca de que el empleo de estas sustancias no presenten complicaciones hemorrágicas.

La inhalación de NO y drogas que aumentan el cGMP en las plaquetas, como nitroprusiato, producen inhibición de la agregación/secreción plaquetaria y prolongan el TS; sin embargo, la traducción clínica de estas observaciones no se conoce.

e) Expansores de volumen

El dextrano 40 o 70 kDa infundido se adsorbe a la superficie de las plaquetas y puede interferir la agregación, secreción y actividad procoagulante plaquetarias por varias horas. Dichos efectos se acompañan en una proporción de pacientes con prolongación del TS. Por estas razones se ha usado el dextrano en la profilaxis de trombosis perioperatoria. No se ha reportado sangrado excesivo con su empleo, excepto si se asocia a heparina. También, altas dosis de hidroxietil almidón (> 20 ml/kg) pueden predisponer a sangrado anormal, especialmente si se asocia a heparina en dosis profiláctica.

f) Otras sustancias y fármacos

Numerosas otras drogas, alimentos o condimentos se han relacionado con inhibición de la función plaquetaria. La traducción clínica de estos efectos es infrecuente, de poca relevancia, y su comunicación en la literatura es mayoritariamente anecdótica. La irrelevancia clínica de estos efectos se ejemplifica con el uso de inhibidores de la recaptura de serotonina en el tratamiento de la enfermedad depresiva; consistentemente inducen una reducción del contenido de serotonina intraplaquetaria, lo que se puede reflejar en un falso defecto de la secreción plaquetaria ex vivo cuando la prueba se realiza mediante marcaje de plaquetas con serotonina marcada con carbono 14 (^{14}C-5-HT); sin embargo, estas drogas no afectan el TS y la agregación plaquetaria es normal. Asimismo, existe abundante literatura que relaciona el efecto de los ácidos grasos omega-3 con la reducción de agregación/secreción plaquetarias y prolongación del TS. En este caso los ácidos omega-3, entre ellos el eicosapentaenoico, desplazan parcialmente al ácido araquidónico en los fosfolípidos de membrana, disminuyendo la producción de tromboxano A_2; simultáneamente, la metabolización de eicosapentaenoico concluye en la generación de tromboxano A_3, sin la capacidad agonista de las plaquetas y actividad vasoconstrictora que tiene el tromboxano A_2. Sin embargo, la ingestión de ácidos grasos omega-3 o de peces ricos en estas sustancias, no se asocia con sangrado anormal. Extractos de cebolla, ajoene (principal compuesto activo derivado del ajo), cúrcuma y otros condimentos y alimentos también son inhibidores de la función plaquetaria, sin mayor relevancia en sangrado anormal.

4. MÉTODOS DE ESTUDIOS PLAQUETARIOS

Las plaquetas juegan un rol clave en la hemostasia, por lo cual sus deficiencias ya sean hereditarias o adquiridas están involucradas en una amplia variedad de desórdenes de sangrado. Existen métodos de estudios plaquetarios que se realizan en los laboratorios para poder ayudar al paciente en su diagnóstico y tratamiento. Estos métodos describen distintos aspectos de las plaquetas, basados en la agregación, adhesión, propiedades viscoelásticas durante la formación del coágulo, evaluación del metabolismo del tromboxano, así como también algunas técnicas por citometría de flujo para estudios de receptores.

a) Medición de TXA2

Como se mencionó anteriormente, el TXA2 es el mayor producto del metabolismo del ácido araquidónico en las plaquetas; luego es transformado en TXB2 y este en 2,3-dinor-TXB2 y 11-dihidro-TXB2, donde los metabolitos del TXA2 pueden ser medidos por ensayos de unión a ligandos y utilizados para monitorear la terapia antiplaquetaria, lo cual reflejaría el efecto in vivo de la aspirina, utilizándose actualmente ensayos de ELISA más que radioinmunoensayo o ensayos inmunoradiométricos.

b) Medición de ATP/ADP

Para la medición de ATP y ADP el método más ampliamente utilizado está basado en una reacción bioluminiscente catalizada por la enzima luciferasa de luciérnaga. Esta reacción puede ser utilizada en 2 pasos, en el cual el contenido de ATP plaquetario que comprende las reservas metabólicas y de los gránulos δ se mide en lisados de plaquetas mediante un ensayo de luciferasa. El ADP derivado de los gránulos δ es convertido a ATP por la enzima fosfoenol-piruvato kinasa. Puede utilizarse en un enfoque similar para medir el contenido de ATP en el sobrenadante de plaquetas lavadas luego de la estimulación con agonistas.

c) Agregación plaquetaria

El estudio *gold standard* de evaluación de la función plaquetaria es la agregometría turbidimétrica, la cual, como su nombre lo indica, mide la agregación de las plaquetas. Este método se basa en la detección de la diferencia en la transmisión de luz por un fotómetro luego de añadir un agonista plaquetario a la muestra, la cual pueden ser plaquetas lavadas o plasma rico en plaquetas (PRP). El estudio entrega una curva de agregación plaquetaria, expresado como porcentaje de la extensión máxima de la agregación, midiendo también fase lag y pendiente ,y área bajo la curva. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada para monitorear las terapias antiplaquetarias, así como también como herramienta diagnóstica en el estudio de desórdenes adquiridos o hereditarios del funcionamiento plaquetario, en este último caso utilizándolo para el diagnóstico de Enfermedad de von Willebrand, así como también síndrome de Bernard-Soulier y Tromboastenia de Glanzmann (Figura 34-6).

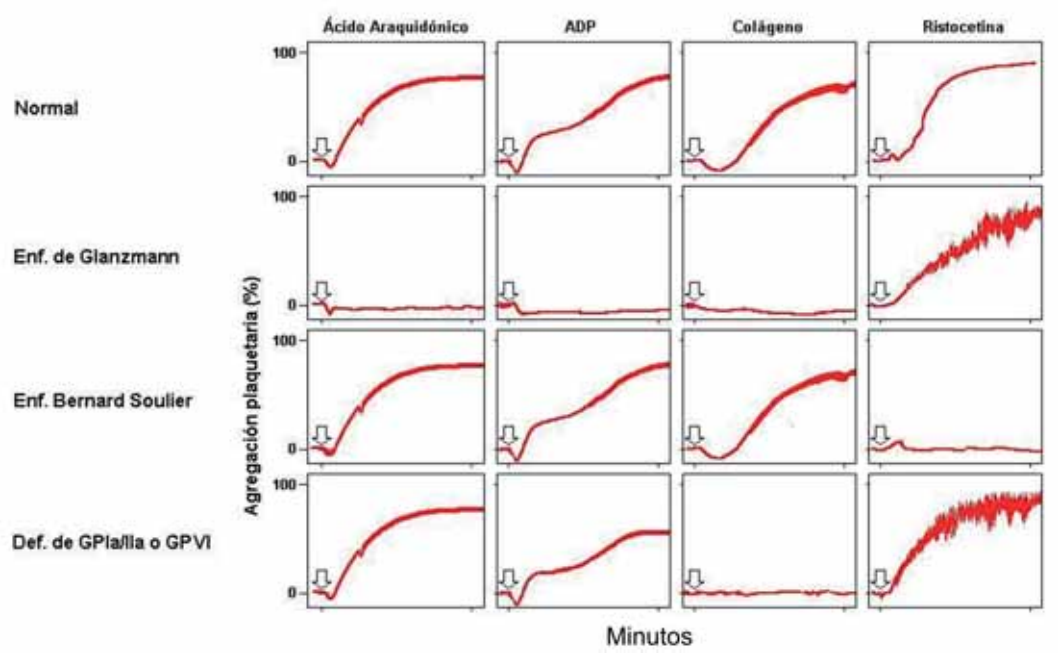


Figura 34-6. Curvas de agregación plaquetaria. Se muestran curvas de agregación plaquetaria de trombocitopatías hereditarias características. En la parte superior se observan curvas de agregación normales usando diferentes agonistas.

La agregometría por impedancia mide el cambio en la impedancia eléctrica entre dos electrodos cuando la agregación plaquetaria es inducida por un agonista. Este método puede ser realizado con sangre total, no considerando la necesidad de la preparación de muestra por centrifugación para la obtención de las plaquetas. Las plaquetas se agregan a las plaquetas que se fijaron a los electrodos, lo cual conlleva a un aumento en la impedancia eléctrica, por lo cual la agregación evalúa detectando el aumento de la impedancia medido en Ohms. Esta técnica evalúa la función de las plaquetas en condiciones más fisiológicas, ya que es realizada en sangre total, permitiendo que los otros elementos presentes en la sangre influyan en la agregación de las plaquetas, y además se lleva a cabo en una superficie sólida, siendo lo más parecido al proceso de adhesión y agregación plaquetario que se lleva a cabo a nivel fisiológico.

d) Tiempo de oclusión

Por otro lado, también es posible mencionar los analizadores de función plaquetaria, como el PFA-100 y el Innovance PFA-200, los cuales miden in vitro el cese del flujo sanguíneo por el tapón plaquetario. Es un método simple, rápido y que no requiere una preparación de la muestra ni tampoco grandes volúmenes de sangre total citratada. Su desventaja radica en que es dependiente del FVW y del nivel de hematocrito. Es posible utilizar cartuchos de colágeno/ADP o colágeno/epinefrina, y recientemente se incorporó el cartucho de P2Y, el cual demostró ser sensible a la inhibición de P2Y12. En este sistema la sangre total con anticoagulante citrato fluye a través de un capilar dentro de los cartuchos

que poseen una membrana recubierta con colágeno con una abertura de 147 µm llena con ADP o epinefrina, donde el tiempo que demora en ocluir la abertura se denomina tiempo de oclusión o tiempo de cierre.

e) Citometría de flujo

En cuanto a la citometría de flujo, el análisis de las plaquetas puede incluir múltiples ensayos con diversos propósitos, como por ejemplo evaluar la activación plaquetaria, expresión de receptores, evaluar la trombopoyesis, diagnóstico de desórdenes de función plaquetaria y monitorear terapia antiplaquetaria. La citometría de flujo es una técnica que mide anticuerpos conjugados a sondas fluorescentes que son capaces de unirse a proteínas específicas en la membrana de las células o en el interior de ellas, mostrando de esta manera su presencia. Un haz de luz excita a las moléculas fluorescentes de las sondas unidas a las plaquetas a un estado de mayor energía, luego la sonda emite luz a diferentes longitudes de onda cuando regresa a un estado de reposo. Gracias a esta técnica es posible diagnosticar desórdenes heredados o adquiridos de la función plaquetaria, como Síndrome de Bernard-Soulier, Tromboastenia de Glanzmann o trombocitopenia inducida por heparina. También es posible utilizarla en el área de medicina transfusional para evaluar el grado de activación de las plaquetas almacenadas. Además, permite evaluar la expresión de fosfatidilserina en la membrana de las plaquetas activadas. También es posible estudiar el cambio conformacional de la GPIIb/IIIa a través del anticuerpo comercial denominado PAC-1, el cual está dirigido contra el sitio de unión a fibrinógeno expuesto por el cambio conformacional en la GPIIb/IIIa durante la activación de las plaquetas. Otro anticuerpo dirigido contra un marcador de superficie de las plaquetas activadas corresponde a CD62P, el cual va dirigido contra P-selectina, la cual solo se expresa en la superficie de las plaquetas luego de la liberación del contenido de los gránulos α. La medición de los niveles de calcio intraplaquetario puede ser realizado mediante el uso de sondas unidas a fluorocromos que se unan al calcio, lo cual puede ser útil para estudiar la cinética de activación plaquetaria y los estados de activación de la plaqueta. La sonda Fluo-3 mide la cinética del calcio intraplaquetario asociado a la activación de las plaquetas, y además se ha reportado que las sondas Fluo-4 y Fluo-5 han sido utilizadas para estudiar el estado de activación de la plaqueta y poder distinguir las plaquetas procoagulantes de las inactivadas, pero no coagulantes.

5. LECTURAS SUGERIDAS

Trombocitopatías Hereditarias
Almomani MH, Mangla A. Bernard Soulier Syndrome. [Updated 2022 Feb 1]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557671/

Bhadra D, Chakraborty S. Bernard-Soulier syndrome (BSS) with uncontrollable menorrhagia. Asian journal of transfusion science. 2020;14(1):93-5.

Botero JP, Lee K, Branchford BR, Bray PF, Freson K, Lambert MP, et al. Glanzmann thrombasthenia: genetic basis and clinical correlates. Haematologica. 2020;105(4):888-94.

Calebiro D, Koszegi Z, Lanoiselée Y, Miljus T, O'Brien S. G protein-coupled receptor-G protein interactions: a single-molecule perspective. Physiological reviews. 2021;101(3):857-906.

Cattaneo M. The platelet P2Y12 receptor for adenosine diphosphate: congenital and drug-induced defects. Blood. 2011;117(7):2102-12.

Ferreira CR, Chen D, Abraham SM, Adams DR, Simon KL, Malicdan MC, et al. Combined alpha-delta platelet storage pool deficiency is associated with mutations in GFI1B. Molecular genetics and metabolism. 2017;120(3):288-94.

French, D.L. "The molecular genetics of Glanzmann´s thromboasthenia". *Platelets* 1998; 9:5-20.

Frontini M. Breaking barriers: Quebec platelet disorder. Blood. 2020;136(23):2603-4.

Gatchet, G. "ADP receptors of platelets and their activation". *Thromb Haemost* 2001; 86:222-32.

Glembotsky AC, De Luca G, Heller PG. A Deep Dive into the Pathology of Gray Platelet Syndrome: New Insights on Immune Dysregulation. *J Blood Med.* 2021;12:719-732.

Grainger JD, Thachil J, Will AM. How we treat the platelet glycoprotein defects; Glanzmann thrombasthenia and Bernard Soulier syndrome in children and adults. British journal of haematology. 2018;182(5):621-32.

Gunay-Aygun M, Zivony-Elboum Y, Gumruk F, Geiger D, Cetin M, Khayat M, et al. Gray platelet syndrome: natural history of a large patient cohort and locus assignment to chromosome 3p. Blood. 2010;116(23):4990-5001.

Huizing M, Malicdan MCV, Wang JA, Pri-Chen H, Hess RA, Fischer R, et al. Hermansky-Pudlak syndrome: Mutation update. Human mutation. 2020;41(3):543-80.

Jiang LJ, Zhao X, Dou ZY, Su QX, Rong ZH. Stormorken Syndrome Caused by a Novel STIM1 Mutation: A Case Report. Frontiers in neurology. 2021;12:522513.

Koessler J, Hermann S, Weber K, Koessler A, Kuhn S, Boeck M, et al. Role of Purinergic Receptor Expression and Function for Reduced Responsiveness to Adenosine Diphosphate in Washed Human Platelets. PloS one. 2016;11(1):e0147370.

Kubisz P, Holly P, Stasko J. Sticky Platelet Syndrome: 35 Years of Growing Evidence. Seminars in thrombosis and hemostasis. 2019;45(1):61-8.

Malik MA, Masab M. Wiskott-Aldrich Syndrome. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.; 2022.

Millington-Burgess SL, Harper MT. Gene of the issue: ANO6 and Scott Syndrome. Platelets. 2020;31(7):964-7.

Özdemir ZC, Düzenli Kar Y, Ceylaner S, Bör Ö. A novel mutation in the GP1BA gene in Bernard-Soulier syndrome. Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis. 2020;31(1):83-6.

Richard W. Lo, Ling Li, Fred G. Pluthero, Richard Leung, Koji Eto, Walter H. A. Kahr; The endoplasmic reticulum protein SEC22B interacts with NBEAL2 and is required for megakaryocyte α-granule biogenesis. *Blood* 2020; 136 (6): 715–725. doi: https://doi.org/10.1182/blood.2019004276

Rao AK, Rao DA. Gray platelet syndrome: immunity goes awry. Blood. 2020;136(17):1898-900.

Rivera Pozo, J., Lozano Almela, M.L., Vicente García, V. "Trombopatías Congénitas. Bases Moleculares y Aspectos Clínicos" En: Hematología, García-Conde, J., San Miguel, J., Sierra, J., Urbano-Espizua, A., Vicente, V., Vives, J.L., Corrons, eds., ARÁN Eds, Madrid, Capít. 3.3, 2003, pp. 353-367.

Rucker D, Dhamoon AS. Physiology, Thromboxane A2. [Updated 2021 Sep 14]. StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539817/

Sims MC, Mayer L, Collins JH, Bariana TK, Megy K, Lavenu-Bombled C, et al. Novel manifestations of immune dysregulation and granule defects in gray platelet syndrome. Blood. 2020;136(17):1956-67.

Sriram K, Insel PA. Proteinase-activated receptor 1: A target for repurposing in the treatment of COVID-19? British journal of pharmacology. 2020;177(21):4971-4.

Tariq H, Perez Botero J, Higgins RA, Medina EA. Gray Platelet Syndrome Presenting With Pancytopenia, Splenomegaly, and Bone Marrow Fibrosis: Case Report With a Novel NBEAL2 Mutation. American journal of clinical pathology. 2021;156(2):253-8.

Yamaguchi M, Matsui M, Higa R, Yamazaki Y, Ikari A, Miyake M, et al. A platelet-activating factor (PAF) receptor deficiency exacerbates diet-induced obesity but PAF/PAF receptor signaling does not contribute to the development of obesity-induced chronic inflammation. Biochemical pharmacology. 2015;93(4):482-95.

Trombocitopatías Adquiridas

Bakchoul T, Greinacher A. Acquired Thrombocytopenia. In: Schulze H, Italiano J, editors. Molecular and Cellular Biology of Platelet Formation: Implications in Health and Disease. Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 327-49.

Cases, A., Escolar, G., Reverter, J.C., Ordinas, A., López-Pedret, J., Revert, L., *et al*. "Recombinant human erythropoietin treatment improves platelet function in uremic patients". *Kidney Int;* 42: 668-672, 1992.

Della Torre V, Robba C, Pelosi P, Bilotta F. Extra corporeal membrane oxygenation in the critical trauma patient. Current opinion in anaesthesiology. 2019;32(2):234-41.

Laffi, G., Foschi, M., Masini, E., Simoni, A., Mugnai, L., La Villa, G., *et al*. "Increased production of nitric oxide by neutrophils and monocytes from cirrhotic patients with ascites and hyperdynamic circulation". *Hepatology*; 22: 1666-1673, 1995.

Northup PG, Lisman T, Roberts LN. Treatment of bleeding in patients with liver disease. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH. 2021;19(7):1644-52.

Liu, Y.K., Kosfeld, R.E., Marcum, S.G. "Treatment of uraemic bleeding with conjugated oestrogen". *Lancet;* ii: 887-890, 1984.

Mannucci, P.M., Remuzzi, G., Pusineri, F., Lombardi, R., Valsecchi, C., Mecca, G., *et al.* "Deamino-8-D-arginine vasopressin shortens the bleeding time in uremia". *N Engl J Med;* 308: 8-12, 1983.

Mezzano, D., Aranda, E., Urzúa, J., Lema, G., Habash, J., Irarrázabal, M.J., *et al.* "Changes in platelet β-thromboglobulin, fibrinogen, albumin, 5-hydroxytryptamine, ATP, and ADP during and after surgery with extracorporeal circulation in man". *Am J Hematol;* 22: 133-142, 1986.

Mezzano, D., Panes, O., Pais, E., Tagle, R., González, F., Mezzano, S,. *et al*. "Tranexamic acid inhibits fibrinolysis, shortens the bleeding time and improves platelet function in patients with chronic renal failure". *Thromb Haemostas;* 82:1250-1254, 1999.

Mezzano, D., Tagle, R., Panes, O., Pérez, M., Downey, P., Muñoz, B., *et al.* "Hemostatic disorder of uremia: the platelet defect, main determinant of the prolonged bleeding time, is correlated with indices of activation of coagulation and fibrinolysis". *Thromb Hemostas* 76: 312-321, 1996.

Muñoz, J.J., Birkmeyer, N.J., Birkmeyer, J.D., O´Connor, G.T., Dacey, L.J. "Is epsilon-aminocaproic acid as effective as aprotinin in reducing bleeding with cardiac surgery?: a metanalysis". *Circulation;* 99: 81-89, 1999.

Noris, M., Remuzzi, G. "Uremic bleeding: closing the circle after 30 years of controversies?" *Blood;* 94: 2569-2574, 1999.

Northup PG, Lisman T, Roberts LN. Treatment of bleeding in patients with liver disease. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH. 2021;19(7):1644-52.

Métodos de Estudio Plaquetarios

Kamath S, Blann AD, Lip GYH. Platelet activation: assessment and quantification. European Heart Journal. 2001;22(17):1561-71.

Koltai K, Kesmarky G, Feher G, Tibold A, Toth K. Platelet Aggregometry Testing: Molecular Mechanisms, Techniques and Clinical Implications. International journal of molecular sciences. 2017;18(8).

Mumford AD, Frelinger AL, 3rd, Gachet C, Gresele P, Noris P, Harrison P, et al. A review of platelet secretion assays for the diagnosis of inherited platelet secretion disorders. Thrombosis and haemostasis. 2015;114(1):14-25.

Navred K, Martin M, Ekdahl L, Zetterberg E, Andersson NG, Strandberg K, et al. A simplified flow cytometric method for detection of inherited platelet disorders—A comparison to the gold standard light transmission aggregometry. PloS one. 2019;14(1):e0211130.

Saboor M, Moinuddin M, Ilyas S. New horizons in platelets flow cytometry. The Malaysian journal of medical sciences : MJMS. 2013;20(2):62-6.

Tsoupras A, Zabetakis I, Lordan R. Platelet aggregometry assay for evaluating the effects of platelet agonists and antiplatelet compounds on platelet function in vitro. MethodsX. 2019;6:63-70.

Tyagi T, Jain K, Gu SX, Qiu M, Gu VW, Melchinger H, et al. A guide to molecular and functional investigations of platelets to bridge basic and clinical sciences. Nature Cardiovascular Research. 2022;1(3):223-37.

Tynngård N, Wallstedt M, Södergren AL, Faxälv L, Ramström S. Platelet adhesion changes during storage studied with a novel method using flow cytometry and protein-coated beads. Platelets. 2015;26(2):177-85.

Capítulo

35

ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND

Jaime Pereira G., Iván Palomo G.

Resumen

1. Introducción

2. Factor von Willebrand
2.1. Estructura del FVW
2.2. Biosíntesis y secreción del FVW
2.3. Función del FVW
2.4. Regulación de los niveles sanguíneos del FVW

3. Clasificación de la Enfermedad de von Willebrand
3.1. EvW tipo 1
3.2. EvW tipo 2
3.3. EvW tipo 3

4. Clínica de la Enfermedad de von Willebrand

5. Diagnóstico de la Enfermedad de von Willebrand
5.1. Pruebas específicas
5.2. Pruebas para diagnóstico de subtipos
5.3. Dificultades diagnósticas de la EvW

6. Tratamiento de la Enfermedad de von Willebrand

7. Lecturas sugeridas

RESUMEN

A la Enfermedad de von Willebrand (EvW) se le reconoce como el trastorno hemorragíparo hereditario más frecuente. Se caracteriza por un defecto cuantitativo y/o funcional del factor von Willebrand (FVW) el que es normalmente sintetizado en las células endoteliales y en los megacariocitos. El FVW participa en la hemostasia primaria sirviendo de puente entre el colágeno y el complejo GPIb-IX de las plaquetas, y en la hemostasia secundaria transportando al FVIII.

La EvW, en general se presenta como un cuadro hemorrágico mucocutáneo y se le ha clasificado en tres tipos principales: tipo 1 (alteraciones cuantitativas parciales del FVW), tipo 2 (alteraciones cualitativas o disfuncionalidad del FVW) y tipo 3 (deficiencia total o presencia de trazas de FVW). Para su diagnóstico se requiere de varias pruebas de laboratorio.

1. INTRODUCCIÓN

Desde el punto de vista clínico, las enfermedades hemorragíparas pueden presentarse, en general, como síndromes hemorragíparos músculo esqueléticos o mucocutáneos. Este capítulo se refiere a la Enfermedad de von Willebrand (EvW), que al igual que las trombocitopatías y trombocitopenias, se presenta como síndrome hemorrágico mucocutáneo.

La EvW fue descrita en Finlandia por el Dr. Erik von Willebrand (1926) como un trastorno hemorragíparo que llamó pseudohemofilia. Observó que la enfermedad se presentaba en ambos sexos y la epistaxis era un síntoma frecuente, y entre las pruebas de laboratorio se observaba prolongación del tiempo de sangría y recuento de plaquetas normal. Aproximadamente 40 años más tarde se demostró que la EvW se debía a la deficiencia de factor plasmático que se denominó factor von Willebrand (FVW), observándose posteriormente que la enfermedad se explica por déficit o alteración funcional del FVW.

A la EvW se le considera el síndrome hemorrágico hereditario más frecuente (cerca del 1% de la población, sin que ello signifique que todos sean sintomáticos).

En este capítulo se describe las características fundamentales del FVW, algo de la presentación clínica, clasificación de los diferentes tipos de EvW y el abordaje desde el punto de vista del laboratorio.

2. FACTOR VON WILLEBRAND

2.1. Estructura del FVW

El gen que codifica el FVW se ubica en el cromosoma 12 y posee 52 exones. El monómero maduro de FVW contiene 2.050 aminoácidos con un peso molecular de 270 kDa.

La figura 35-1 muestra un monómero de FVW con los dominios A, C y D. Allí se indican los dominios de unión a FVIII, a Colágeno, y a las glicoproteínas plaquetarias GPIb-IX y GPIIb-IIIa.

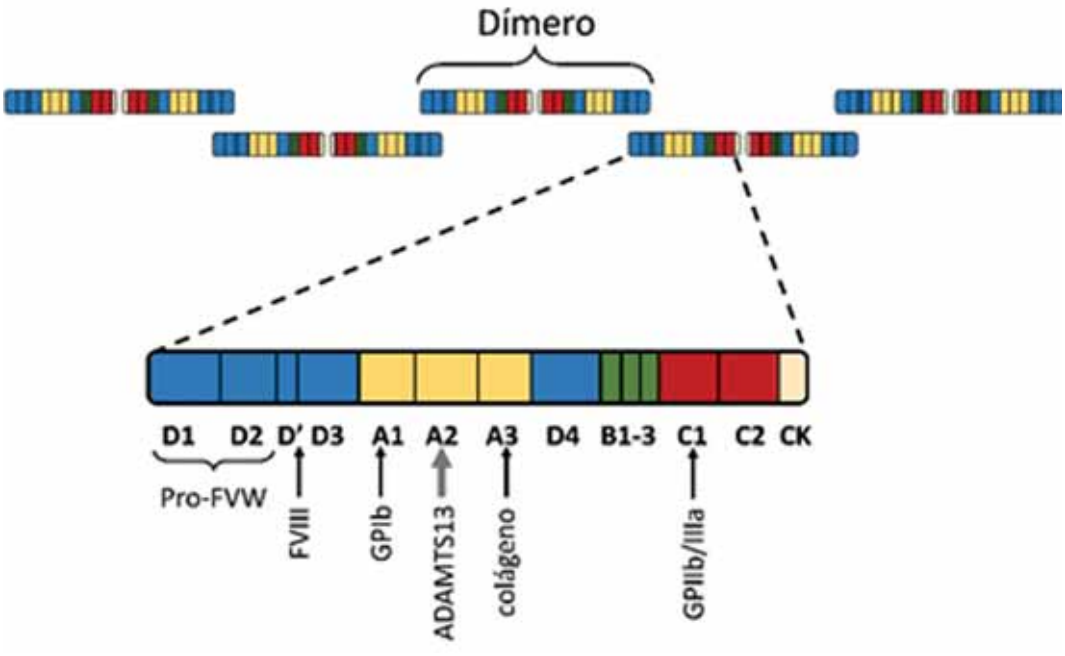


Figura 35-1. Estructura del FVW. Se indican los dominios estructurales y los sitios de unión para diferentes moléculas.

2.2. Síntesis y almacenamiento del FVW

El FVW es sintetizado en los megacariocitos y en las células endoteliales. Luego que se elimina el péptido señal, en el retículo endoplásmico el proFVW forma dímeros mediante la formación de puentes disulfuro entre residuos de cisteína del extremo C-terminal (dominio CK). Los dímeros de proFVW formados son transportados al aparato de Golgi; allí son glicosilados y sulfonados, y polimerizan mediante la formación de puentes disulfuro a través de sus extremos N-terminales (dominios D3). Finalmente, los multímeros, son almacenados en los gránulos alfa de las plaquetas y en los cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales. El tamaño de los multímeros de FVW, para una hemostasis normal, es controlado por la enzima ADAMTS13.

2.3. Función del FVW

El FVW participa en la adhesión plaquetaria a las zonas de daño vascular (hemostasia primaria), y en el transporte y estabilización del FVIII (hemostasia secundaria).

Participación en la hemostasia primaria. El FVW, forma un puente entre dos moléculas, una en la matriz subendotelial y otra en las plaqueta (Adhesión plaquetaria). En el primer caso lo hace a través de su dominio A3 uniéndose al colágeno y por otra parte el dominio Al se une a la GPIbα (complejo GPIb/IX/V) plaquetario (Figura 35-2). Por otra parte, el FVW, también puede participar en la agregación plaquetaria a través de la secuencia RGD (arginina, ácido glutámico y ácido aspártico) del dominio C2, uniéndose al complejo GPIIb-IIIa de las plaquetas activadas. Ambas interacciones del FVW son expresadas en los multímeros de alto peso molecular. Solo los multímeros de FVW de tamaño adecuado, son hemostáticamente activos, por lo que cualquier defecto en la multimerización del factor se traducirá en un defecto de su función.

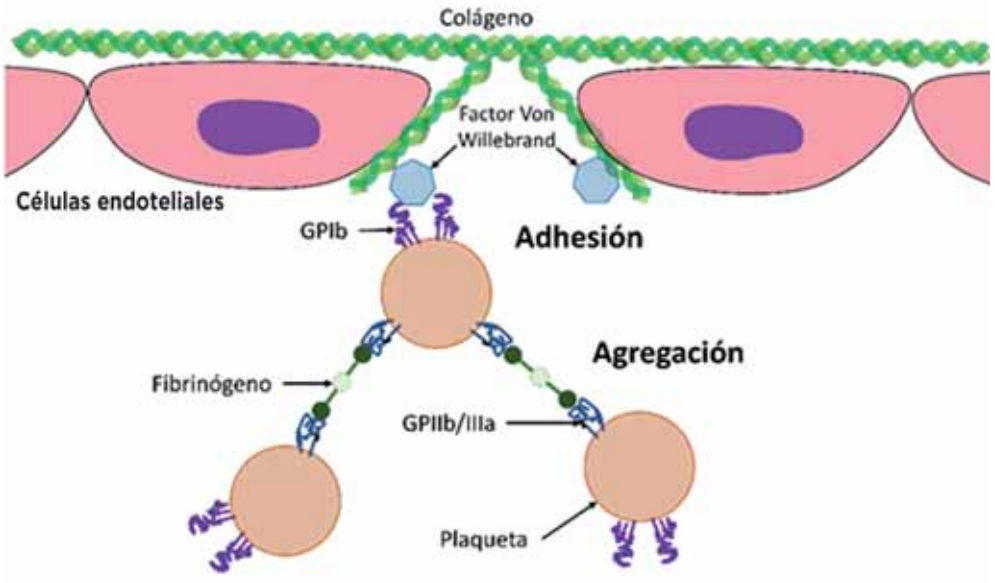


Figura 35-2. Interacción del FVW con colágeno y plaquetas.

Transporte de FVIII. El FVW une al FVIII de modo no covalente a través del dominio D` presente en cada monómero; así transporta a este último en el plasma. No más de 2% de los monómeros de FVW están ocupados con FVIII. El complejo FVW/FVIII permite que el FVW proteja al FVIII de la inactivación por la proteína C activada, FIXa y FXa, prolongando su vida media en circulación desde aproximadamente 2 horas a 12-20 horas. Esto explica por qué niveles bajos de FVW se asocian a una disminución de FVIII.

2.4. Regulación de los niveles sanguíneos del FVW

La concentración plasmática normal de FVW fluctúa entre 4 a 24 pg/mL (10 pg = 1 UI). Se ha observado que el nivel plasmático de FVW se relaciona con los grupos sanguíneos del sistema ABO; así, en individuos de grupo O la concentración es 25% menor que en personas que tienen grupos A, B y AB.

Por otra parte, la concentración plasmática de FVW aumenta con el envejecimiento, embarazo y en respuesta a varios estímulos: estrés adrenérgico (ejercicio, trauma, cirugía), vasopresina, hormona del crecimiento y estrógenos. Estos estímulos actuarían sobre las células endoteliales induciendo la liberación de FVW almacenado en los cuerpos de Weibel-Palade.

El tamaño de los multímeros de FvW es regulado por la acción de la enzima ADAMTS-13, una metaloproteinasa que disminuye el peso molecular de los multímeros causando un corte entre los aminoácidos Tyr842 y Met843. Esta proteolisis específica explica el amplio espectro de tamaños de los multímeros en circulación, desde dímeros de 500 kDa hasta multímeros de 20.000 kDa.

3. CLASIFICACIÓN DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND

La EvW es causada por un defecto cuantitativo o cualitativo del FVW (Tabla 35-1). Dependiendo de la deficiencia, la EvW se ha clasificado en tres tipos principales. La EvW tipo 1 se caracteriza por alteraciones cuantitativas parciales del FVW; la EvW tipo 2 incluye cuatro variantes/subtipos (2A, 2B, 2M y 2N) que presentan anormalidades cualitativas de la estructura y función del FVW, y la EvW tipo 3 se refiere a la deficiencia total o presencia de trazas de FVW.

Tabla 35-1. Clasificación de la Enfermedad de von Willebrand

Tipo	Características
1	Deficiencia cuantitativa parcial de FVW
2A	Variante cualitativa con disminución de la función plaquetaria y pérdida de multímeros de alto peso molecular
2M	Variante cualitativa con disminución de la función plaquetaria y conservación de los multímeros de alto peso molecular
2B	Variante cualitativa con aumento de la afinidad del FVW por la GPIb
2N	Variante cualitativa con defecto de unión del FVIII al FVW
3	Ausencia total del FVWdetectable y marcada disminución del FVIII

A continuación se describen las principales características de los tipos y subtipos de EvW.

3.1. EvW tipo 1

La principal característica de la EvW tipo 1 es presentar una deficiencia parcial del FVW. Los niveles plasmáticos del FVW presentan una reducción del 15 al 50%, pero no existe anormalidad en su función. La distribución de los multímeros en el plasma es normal. Se han descrito subgrupos de la EvW tipo 1 de acuerdo a los niveles plasmáticos relativos de FVW, lo que indica que existen distintos mecanismos fisiopatológicos. Generalmente el fenotipo se hereda de modo autosómico dominante. Algunos individuos heterocigotos son portadores asintomáticos. Las alteraciones genéticas descritas consisten principalmente en pequeñas deleciones, cambios en el marco de lectura y mutaciones sin sentido.

3.2. EvW tipo 2

a) EvW tipo 2A

En la EvW tipo 2A la adhesión plaquetaria, que en buena parte es dependiente del FVW, está alterada por ausencia de multímeros de alto y mediano peso molecular. En la mayoría de los casos se hereda de modo autosómico dominante, aunque también existen variantes recesivas.

Se han descrito mutaciones sin sentido producidas por dos mecanismos posibles: (a) Mutaciones que alteran el transporte intracelular del FVW e impiden el ensamblaje, almacenamiento y secreción de los multímeros de alto peso molecular y (b) Mutaciones que provocan en los multímeros una mayor susceptibilidad a la proteolisis in vivo, son más sensibles a la ADAMTS-13. Entre otras mutaciones, en el dominio CK del extremo C-terminal impiden la formación del puente disulfuro necesario para formar los dímeros.

b) EvW tipo 2B

La EvW tipo 2B se caracteriza por un aumento de la afinidad del FVW mutante por la GPIbα de las plaquetas. Esto causa la unión de multímeros de alto peso molecular a las plaquetas, seguido por la remoción esplénica y trombocitopenia leve. Adicionalmente disminuyen los multímeros de alto peso molecular plasmáticos y los restantes no son hemostáticamente activos. En la mayoría de los casos la herencia es de tipo autosómico dominante. Se han descrito varias mutaciones, la mayoría sin sentido y afectan al dominio Al donde se encuentra el sitio de unión a la GPIbα.

c) EvW tipo 2M

En la EvW tipo 2M (M = Multímero) la distribución de los multímeros del FVW de diferentes tamaños es normal, pero presenta disminución de la afinidad a las plaquetas. Se hereda de modo autosómico dominante. Se han descrito varias mutaciones y todas afectan al dominio AI, donde se une la GPIbα.

d) EvW tipo 2N

La FVW tipo 2N (N = Normandía) posee niveles normales de FVW, con una distribución plasmática normal de los multímeros de diferente tamaño, como tampoco presenta alteraciones la unión a las plaquetas. Se han descrito varias mutaciones sin sentido en los dominios D` y D3 del FVW. Estas provocan un defecto en la unión al FVIII, disminuyendo su vida media, lo que explica la reducción de la concentración plasmática de FVIII en al menos 25%, asemejándose a la hemofilia A leve.

Los pacientes que presentan este subtipo de EvW son homocigotos para este tipo de alelo, por lo tanto la herencia es autosómica recesiva. Podría ocurrir doble mutación, de EvW tipo 2N y tipo 1 (heterocigoto compuesto).

3.3. EvW tipo 3

La forma menos frecuente y la más grave de EvW es el tipo 3. Los pacientes presentan un déficit completo o casi total del FVW. Debido a la ausencia de FVW para transportar y estabilizar al FVIII, la concentración plasmática de este disminuye a nivel de 10% o menos respecto de lo normal. Los pacientes presentan alteración de la hemostasia primaria y secundaria (Coagulación).

Entre las mutaciones se han observado deleciones totales o parciales del gen, mutaciones sin sentido y mutaciones del “splicing” o de cambio de marco de lectura, todas las cuales impiden la síntesis del FVW. Se hereda de modo autosómico y se presenta solo en pacientes homocigotos para los dos alelos mutantes.

4. CLÍNICA DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND

La alteración en la adhesión plaquetaria, por disminución de la concentración plasmática de FvW se expresa clínicamente en un síndrome hemorragíparo mucocutáneo, siendo más frecuentes la epistaxis y la menorragia. Otras expresiones clínicas son equimosis, hemorragia luego de pequeños cortes o heridas leves y sangrado gingival. La hemorragia posterior a extracciones dentales es frecuente en pacientes con EvW. La expresión clínica es usualmente leve en la EvW tipo 1 y aumenta en los tipos 2 y 3. Sin embargo, la gravedad de las manifestaciones hemorrágicas puede variar, incluso dentro de la misma familia, y a través del tiempo en un mismo individuo. Esto puede deberse a que la penetrancia es variable y a la expresividad de la enfermedad.

En la EvW tipo 1, debido a que el FVIII está levemente disminuido, alteraciones importantes de la hemostasia son infrecuentes y son principalmente post-trauma. Por el contrario, en las EvW tipo 2N y 3, dado que presentan niveles suficientemente bajos de FVIII, pueden desarrollar hemorragias articulares o de tejidos blandos, semejantes a los observados en pacientes con hemofilia.

La EvW durante el embarazo y el parto, generalmente es bien tolerada en la mayoría de las pacientes (excepto tipo 3) dado que los niveles plasmáticos de FVW y FVIII aumentan. Después del parto estos niveles bajan y consecuentemente el riesgo de hemorragia aumenta, por lo que las pacientes deberían ser monitorizadas por al menos una semana después. Las mujeres embarazadas con EvW tipo 2B pueden presentar complicaciones durante el parto; ello porque el FVW mutado favorece la aparición de trombocitopenia.

Es poco frecuente el desarrollo de aloanticuerpos anti-FVW. Los casos descritos se han presentado en pacientes con EVW tipo 3 con cantidades no detectables de FVW.

5. DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND

El diagnóstico de la evW se basa en la historia personal de sangrado, historia familiar y una combinación de pruebas de laboratorio que demuestran una alteración del FvW.

Con respecto a la historia de sangrado, se debe evaluar en forma detallada todos los síntomas de sangrado en el paciente y sus familiares. La cuantificación del fenotipo hemorrágico ha tomado particular relevancia en los últimos años. Con este fin se han desarrollado sistemas de cuantificación basados en cuestionarios estructurados, conocidos como Instrumentos de Evaluación de Sangrado (“BATs” por sus siglas en inglés). Actualmente, para pacientes con una probabilidad baja de ser portadores de una EvW (p. ej., consulta en atención primaria), se recomienda utilizar una herramienta de evaluación de sangrado (BAT) validada, como evaluación inicial para determinar quién necesita pruebas de laboratorio específicas.

Las pruebas consideradas clásicamente como de tamizaje en el diagnóstico de la EvW, el tiempo de sangría y tiempo de cierre en prueba con alta fuerza de cizalla (Platelet Function Analyzer, PFA 200), han demostrado una muy pobre sensibilidad y especificidad, especialmente en los casos de EvW leve o moderada, por lo que actualmente su uso no está recomendado en la evaluación de los pacientes con hemorragias mucocutáneas.

El diagnóstico de EvW se basa en la medición del antígeno del FvW, el nivel de una prueba de adhesión dependiente de FvW, clásicamente medida como el cofactor Ristocetina y el nivel de actividad coagulante del FVIII.

5.1. Pruebas específicas

La tabla 35-2 resume los hallazgos en pruebas específicas para diagnóstico de EvW. A continuación se describen brevemente algunos aspectos sobre cada una de ellas.

Factor von Willebrand antigénico (FVW:Ag). Actualmente en la mayoría de los laboratorios de hemostasia, la concentración plasmática de FVW se mide por ELISA. Está disminuida en personas con defectos cuantitativos (EvW tipo 1 y 3), mientras que pueden ser normales en las variantes de la EvW tipo 2.

Actividad coagulante del FVIII (FVIII:C). Debido a que la secreción del FVIII, así como su vida media dependen del FVW, generalmente los valores de FVIII:C son paralelos al FVW:Ag. Esta prueba es fundamental para la detección de pacientes del tipo 2N.

Actividad del FVW como cofactor de la ristocetina (FVW:RCo). Esta prueba estudia la capacidad de unión del FVW con la GPIbα y para ello se utiliza agregómetro. Debido a que los multímeros del FVW de alto peso molecular son necesarios para la aglutinación inducida por ristocetina, la razón FVW:Ag/ FVW:RCo está significativamente disminuida en la EvW tipo 2A (ausencia de multímeros de alto peso molecular) y en la EvW tipo 2M (interacción alterada de los multímeros con la GPIbα). Las personas portadoras de EvW tipos 1, 2N y 3 se caracterizan por tener normal la razón FVW:Ag/FVW:RCo.

5.2. Pruebas para diagnóstico de subtipos

Estas pruebas no son necesarias para hacer el diagnóstico de EvW, pero sí para realizar el diagnóstico diferencial entre los diferentes subtipos.

Agregación plaquetaria inducida por ristocetina (RIPA). El resultado de RIPA depende de la concentración de FVW y de su afinidad por la GPIbα. La prueba es indetectable en pacientes con EvW tipo 3, pero puede ser normal en pacientes con EvW tipo 1. En pacientes con EvW tipo 2A y tipo 2M el resultado de la prueba es muy bajo o ausente. La prueba RIPA es muy útil para detectar pacientes con EvW tipo 2B, ya que presentan agregación plaquetaria a bajas concentraciones de ristocetina (0,6 mg/mL), lo que no ocurre con plasma rico en plaquetas de individuos normales.

Análisis multimérico del FVW plasmático. Para su determinación se utiliza inmunoelectroforesis. Los multímeros de alto y mediano peso molecular están ausentes en la EvW tipo 2A y los de alto peso molecular usualmente ausentes en el tipo 2B.

Capacidad de unión del FVW al colágeno (FVW:CB). La unión del FVW al colágeno fijo en microplaca depende solo de los multímeros de alto peso molecular. La razón FVW:Ag/ FVW:CB permite distinguir entre EvW tipo 1 ó tipo 2.

Capacidad de unión del FVW al FVIII. Esta prueba permite distinguir la EvW tipo 2N, ya que en este subtipo el FVW presenta disminución de su capacidad de unión al FVIII.

Tabla 35-2. Pruebas de laboratorio y algunas características de los tipos de la enfermedad de von Willebrand

Prueba o característica	Tipo 1	Tipo 2				Tipo 3
		2A	2B	2M	2N	
FVIII	Disminuido	Disminuido	Disminuido o normal	Disminuido o normal	Ligeramente disminuido	Marcadamente disminuido
FVIII:C (U/dl)	Disminuido o normal	Disminuido o normal	Disminuido o normal	Disminuido o normal	0.1-0.4	0.05-0. 1
FVW:Ag	Disminuido	Disminuido	Disminuido	Disminuido	Disminuido o normal	Marcadamente disminuido
FVW:RCo	Disminuido	Ligeramente disminuido	Ligeramente disminuido	Ligeramente disminuido	Disminuido o normal	Ligeramente disminuido
FVW:RCo/FVW:Ag	> 0.6	< 0.6	< 0.6	< 0.6	> 0.6	NU
RIPA (mg/ml)	Disminuida o normal	Disminuida	Incrementada o normal	Disminuido	Normal	Ausente
Multímeros	Normales	MAP ausentes MPI disminuidos	MAP ausentes o disminuidos	Presentes	Presentes	Ausentes
Características	Deficit parcial de VWF	Alteración cualitativo	Alt. Cualitativa Aumento afinidad a GPIb/IX	Alt. Cualitativa con disminución función plaquetaria	Alt. Cualitativa Disminución de unión FVIII	Deficit cuantitativo Disminución de FVIII
Frecuencia (%)	70-78	10-15	< 5%	Raro	Raro	1-5/106
Herencia autosómica	Dominante o codominante	Codominante rara vez recesiva	Codominante	Codominante	Recesiva	Recesiva

MAP: multímeros de alto peso molecular; FVIII: factor VIII de la coagulación; FVIII:C: factor VIII coagulante; MPI: multímeros de peso molecular intermedio; NU: no es útil; RIPA: agregación plaquetaria inducida por ristocetina; FVW: factor de von Willebrand; FVW:Ag: FVW antigénico; FVW:RCo: FVW como cofactor de la ristocetina.

5.3. Dificultades diagnósticas de la EvW

De acuerdo a los criterios descritos más arriba, el diagnóstico de la variantes de la EvW y del tipo 3, es relativamente claro. Sin embargo, en muchas ocasiones, el diagnóstico definitivo de EvW tipo 1 presenta muchas dificultades. Por definición, la enfermedad tipo 1 se caracteriza fenotípicamente por una reducción parcial del nivel de FvW, pero es particularmente difícil determinar un nivel de corte inequívoco para el factor de von Willebrand. Cuanto más bajo sea el nivel, más consistente será fenotipo hemorrágico, el patrón de herencia y la identificación de mutaciones de VWF. En general, niveles de FvW por debajo de 30 UI/dl se consideran diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand. Existe consenso actual que pacientes con síntomas de sangrado que presentan niveles de factor de von Willebrand entre 30 y 50 U/dl (límite inferior del rango normal) se clasifican como que tienen un “factor de von Willebrand bajo” o “posible enfermedad tipo 1” pero no se clasifican como aquellos que si tienen enfermedad de von Willebrand definitiva. Con respecto a las manifestaciones clínicas, estudios recientes usando cuestionarios estandarizados validados mostraron que una proporción no menor de estos pacientes con “FvW bajo” muestran un fenotipo de sangrado significativo. En cuanto al manejo, aunque no existe consenso sobre tratamiento específico en estos pacientes, aunque se recomienda medidas de prevención en caso de cirugías o procedimientos invasivos.

El otro fenómeno que también dificulta el diagnóstico de EvW lo constituye el alza fisiológica del FvW con la edad. Es el caso de pacientes de edad avanzada en los cuales se hizo el diagnóstico de EvW cuando jóvenes, pero que actualmente sus valores de FvW están por sobre el punto de corte. Sin embargo, estos pacientes aún presentan un riesgo de sangrado significativo que debe ser considerado en situaciones de riesgo.

6. TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND

Dado que la expresión clínica en los pacientes con EvW sintomática es un síndrome hemorrágico mucocutáneo, pero que según la magnitud de la alteración y el tipo, puede afectar también la coagulación (FVIII), el tratamiento tiene el propósito de normalizar el tiempo de sangría (hemostasia primaria) y el trastorno de coagulación sanguínea. Para conseguir lo anterior, tanto la concentración de FVW:Ag y la medición de FVIII:C deben aumentar en el plasma. Aun cuando el manejo de la enfermedad depende del tipo de EvW de que se trate, a continuación se mencionan algunos elementos generales:

a) Inducción de la liberación de FVW. La mayor secreción de FVW desde los cuerpos de Weibel-Palade se consigue administrando DDAVP (Desmopresina). Idealmente utilizar la prueba de desmopresina, por ejemplo en cirugía electiva.

b) Tratamiento de reemplazo. El déficit de FVW y FVIII se puede manejar administrando crioprecipitados (rico en FVWW, FVIII y fibrinógeno) y concentra-

dos de factores liofilizados (Ej. Humate-P y Alphanate SD). Luego de la terapia de reemplazo, pueden desarrollarse anticuerpos inhibidores.

c) Antifibrinolíticos. Los fármacos antifibrinolíticos disminuyen la actividad del sistema fibrinolítico. En EvW se indican después de epistaxis, y sangrados orales y de otro origen. Entre los antifibrinolíticos se encuentran el ácidoaminocaproico y el ácido tranexánico.

LECTURAS SUGERIDAS

Calmette L, Clauser S. Von Willebrand disease. Rev Med Interne, 2018;39(12):918-924.

Connell NT, Flood VH, Brignardello-Petersen R, Abdul-Kadir R, Arapshian A, Couper S, Grow JM, Kouides P, Laffan M, Lavin M, Leebeek FWG, O'Brien SH, Ozelo MC, Tosetto A, Weyand AC, James PD, Kalot MA, Husainat N, Mustafa RA. ASH ISTH NHF WFH 2021 guidelines on the management of von Willebrand disease. Blood Adv. 2021 Jan 12;5(1):301-325.

Denis C, Susen S, Lenting P. von Willebrand disease: what does the future hold? Blood, 2021, 29;137(17):2299-2306.

Ginsburg, D., Wagner, D. "Structure, biology, and genetic of von willebrand factor" En: Hematology: Basic Principles and Practice, Hoffinan (ed.). Third edition. Editorial Churchill Livingstone 2000. pp 1937 - 1943.

James P, Connell N, Ameer B, Di Paola J, Eikenboom J, Giraud N, et al Guidelines on the diagnosis of von Willebrand disease, ASH ISTH NHF WFH, Clinical Guidelines. Blood Advances 5 (1): 280–300, 2021.

Leebeek FW, Eikenboom JC. Von Willebrand's Disease. N Engl J Med. 2016 Nov 24;375(21):2067-2080.

O'Donnell JS. Low VWF: insights into pathogenesis, diagnosis, and clinical management. Blood Adv. 2020 Jul 14;4(13):3191-3199.

Ruan, C. "Molecular diagnosis of von Willebrand disease". *Int J Hematol* 2002; 76: 145-148.

Sadler, J.E. "von Willebrand disease type 1: a diagnosis in search of a disease". *Blood* 2003; 101:2089-93.

Sadler JE. Low von Willebrand factor: sometimes a risk factor and sometimes a disease. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2009;106-12.

Swami A, Kaur V. von Willebrand Disease: A Concise Review and Update for the Practicing Physician. Clin Appl Thromb Hemost, 2017 Nov;23(8):900-910.

Weyand A, Flood V. Von Willebrand Disease: Current Status of Diagnosis and Management. Hematol Oncol Clin North Am. 2021 Dec;35(6):1085-1101.

Capítulo

36

HEMOFILIAS Y OTRAS ALTERACIONES HEREDITARIAS DE LA COAGULACIÓN

Pablo Sepúlveda

Resumen

1. Introducción

2. Hemofilia
2.1. Hemofilia clásica o tipo A
2.2. Hemofilia tipo B
2.3. Diagnóstico y clasificación
2.3.1. Diagnóstico mediante pruebas de hemostasia
2.3.2. Diagnóstico precoz en pacientes con antecedentes familiares
2.3.3. Diagnóstico molecular
2.3.4. Diagnóstico prenatal

2.4. Cuadro clínico y manejo
2.4.1. Conceptos generales
2.4.2. Hemorragias graves con riesgo vital inmediato
2.4.3. Hemorragias sin riesgo vital inmediato

2.5. Tratemiento de pacientes con hemofilia sin inhibidores
2.5.1. Terapias de reemplazo
2.5.2. Cálculo de dosis del factor a administrar
2.5.3. Otras opciones terapéuticas
2.6. Inhibidores
2.6.1. Tratamiento de pacientes con hemofilia e inhibidores

3. Otras alteraciones hereditarias de la coagulación
3.1. Alteraciones de fibrinógeno
3.1.1. Afibrinogenemia
3.1.2. Disfibrinogenemia1
3.2. Déficit de factor XIII
3.3. Déficit de protrombina
3.4. Déficit de factor V
3.5. Déficit de factor VII
3.6. Déficit de factor X
3.7. Déficit de factor XI
3.8. Déficit de factor XII
3.9. Déficit de precalicreína
3.10. Déficit de kininógeno de alto peso molecular (HMWK)
3.11. Deficiencia de α2 antiplasmina

4. Lecturas sugeridas

RESUMEN

En este capítulo se describen los aspectos más relevantes de las enfermedades hemorragíparas hereditarias de la coagulación debidas a deficiencia de factores de la coagulación.

Las más frecuentes y conocidas son las hemofilias, que se clasifican en tipo A y B, según se trate de una deficiencia del factor VIII ó IX, respectivamente. Ambas alteraciones son hereditarias y están ligadas al cromosoma X, por lo cual la mayor frecuencia se presenta en en varones. Generalmente los niños heredan un gen mutado (XH) de su madre portadora (XH/X), pero cerca del 30% de los casos sufren una mutación espontánea, sin historia familiar de hemofilia. El diagnóstico se establece con pruebas de coagulación para determinar la concentración plasmática del factor VIII y IX. Las Hemofilias dependiendo de la deficiencia del factor involucrado, se clasifican en leves, moderadas o graves. Durante los últimos años han ocurrido avances en su tratamiento, tanto a demanda como profilaxis, y además aparición de nuevos agentes hemostáticos.

Aunque con menos frecuencia que factores VIII y IX, también se puede presentar déficit o alteraciones funcionales de otros factores: fibrinógeno, factor XIII, protrombina, factor V, factor VII, factor X, factor XI, factor XII, precalicreína y kininógeno de alto peso molecular, los cuales tienen manejos específicos.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades hemorragíparas son una importante causa de consulta médica, y su diagnóstico, si bien puede ser sugerente desde el punto de vista clínico, requiere de la participación fundamental del laboratorio.

Las hemofilias han sido consideradas trastornos graves de la coagulación sanguínea. La hemofilia A se caracteriza por una deficiencia del factor VIII y la hemofilia B por la deficiencia del factor IX, siendo más frecuente la primera.

Otros factores de la coagulación también se pueden ver afectados, en cantidad y/o función; y corresponden a los trastornos raros de la coagulación o Rare Bleeding Disorders (RBD), representado entre el 3 y 5% de las deficiencias hereditarias de la coagulación.

A continuación se abordarán las deficiencias específicas de cada factor de la coagulación, centrado en su diagnóstico y manejo médico.

2. HEMOFILIA

La hemofilia A y B son trastornos hemorrágicos poco frecuentes ligados al cromosoma X, causados por mutaciones en los genes que codifican el factor VIII de coagulación (FVIII) y el factor IX (FIX). La hemofilia A (HA) es más común que la hemofilia B (HB), con una prevalencia de uno en 5.000 nacidos vivos varones en comparación con uno de cada 30.000, respectivamente. Estas deficiencias se deben a distintos tipos de mutaciones ya sean puntuales, deleciones, inserciones, inversiones o grandes reorganizaciones en los genes que codifican estas proteínas.

La gravedad de la enfermedad en la hemofilia se clasifica según el nivel plasmático de actividad FVIII o FIX. Los pacientes con hemofilia grave con frecuencia desarrollan hemorragias en las articulaciones, los músculos o los tejidos blandos de forma espontánea. También pueden sufrir episodios hemorrágicos potencialmente mortales, como hemorragias intracraneales. Las personas con deficiencia de factor leve y moderada rara vez experimentan hemorragias sin causa aparente, y el sangrado excesivo ocurre principalmente después de un trauma o en asociación con procedimientos invasivos.

La actividad del factor residual generalmente se correlaciona bien con las características clínicas; sin embargo, pueden ocurrir fenotipos hemorrágicos heterogéneos entre individuos con los mismos niveles de factores. Además, aunque la HA y la HB generalmente se han considerado clínicamente indistinguibles con diferencias insignificantes en la gravedad y los resultados, varios estudios recientes desafían este concepto, lo que sugiere que los pacientes con HB podrían tener una tendencia a la hemorragia menos grave en comparación con los pacientes con HA con el mismo nivel plasmático residual.

2. 1. Hemofilia clásica o tipo A

La hemofilia A es producida por el déficit cuantitativo del factor VIII coagulante; es congénita, hereditaria, ligada al sexo y con una tasa de mutación en la cual cerca de un 30% de los casos no tiene antecedentes familiares conocidos (mutaciones de novo). Su frecuencia, válida para todas las poblaciones humanas, se estima entre 15-20/10.000 varones.

Gen y FVIII

El gen del factor VIII está localizado en la región distal del brazo largo del cromosoma X a nivel de la banda Xq28. Tiene una longitud de 186 kb y presenta 25 intrones y 26 exones. El gen codifica un mRNA de 9 kb, que traduce una proteína de 2351 aminoácidos (Aa), que incluyen un péptido señal de 19 Aa y una proteína madura de 2332 Aa. La estructura primaria del FVIII muestra 3 tipos distintos de dominios incluyendo una región triplicada de aproximadamente 330 Aa (dominios A), una región única de 980 Aa (dominio B) y una región carboxi-terminal duplicada de 150 Aa (dominios C), las que están en el siguiente orden: NH2.A1-A2-B-A3-C1-C2.COOH.

Alteraciones genéticas

Las alteraciones genéticas descritas en hemofilia A incluyen sustituciones nucleotídicas puntuales, deleciones, inserciones, duplicaciones e inversiones:

Sustituciones nucleotídicas puntuales. Constituyen en conjunto, el tipo de mutación más frecuente en la hemofilia A. Las mutaciones "nonsense" (aparición de un codón "stop" produciendo la interrupción temprana de la síntesis del FVIII) corresponden a pacientes con hemofilia A severa; en cambio las mutaciones puntuales encontradas en hemofilia A moderada o leve del tipo "missense" (aparición de un codón correspondiente a un Aa distinto). Este último tipo de mutaciones también se encontró en pacientes con el fenotipo severo. El fenotipo clínico de la hemofilia A en distintos pacientes con la misma mutación puntual, no siempre resulta igual.

Deleciones. Las deleciones observadas van desde 1 a 210 kb. El 95% de las deleciones se asocia con el fenotipo severo. Los pacientes con hemofilia A severa causada por deleciones, presentan cinco veces más riesgo de desarrollar inhibidor que aquellos con otro tipo de mutación.

Inserciones. Se han descrito pocos casos de inactivación insercional del gen del FVIII y todos ellos conducen a hemofilia A severa. Dos de ellos involucran la inserción, en el exón 14, de secuencias ajenas al gen del FVIII como es el elemento L1 (secuencias repetitivas humanas que representan retro-transposones no virales).

Duplicaciones. Las duplicaciones son inusuales. La duplicación de 23 kb del intrón 22 insertado entre los exones 23 y 24.

Inversiones. Una disrupción del gen del FVIII, debida a una inversión que separa a los exones 1-22 de los exones 23-26, aproximadamente en 500 Kb, es infrecuente. Esta inversión es el resultado de una recombinación homóloga intracromosómica, debida a la presencia de secuencias repetidas denominadas F8A, que transcriben en forma opuesta y que están presentes en el brazo Xq, fuera y dentro del intrón 22 del gen del FVIII.

2.2. Hemofilia tipo B

La hemofilia B, producida por el déficit cuantitativo del factor IX, es congénita, hereditaria, ligada al sexo y con una frecuencia aproximada de 1,5/100.000 habitantes.

Gen y FIX

El gen del factor IX está localizado en la región distal del brazo largo del cromosoma X a nivel de la banda Xq27.1-27.2. Este tiene una longitud de 34 kb, contiene 7 intrones y 8 exones que codifican una proteína madura de 415 ami-

noácidos. La estructura comienza con el amino terminal Tyr; los primeros 46 residuos son producidos por el segundo y tercer exón, y comprenden la región Gla; los residuos 47 a 127 representan las dos regiones homólogas al factor de crecimiento epidérmico (EGF); los aminoácidos 128 a 195 son codificados por el exón 6; los finales 220 residuos son codificados por los 2 últimos exones y contienen los componentes del sitio activo, el carboxilo terminal o Aa 415 Thr.

Alteraciones genéticas

Muchos pacientes con hemofilia B tienen mutaciones puntuales; la naturaleza de las mutaciones determina los niveles de actividad del FIX. Más de un tercio de las mutaciones afecta a residuos de arginina, donde se produce una mutación de tipo "nonsense", resultando una molécula disfuncional.

Un primer grupo de mutaciones consiste en grandes deleciones y reordenamiento causando deficiencia severa de FIX. Estos pacientes son propensos a desarrollar reacciones anafilácticas graves cuando comienzan con la terapia de reemplazo; estas reacciones se asocian con el desarrollo de inhibidores del FIX.

El segundo grupo consiste en el fenotipo Leyden que es causado por varias mutaciones diferentes en la región promotora del gen FIX. En estos pacientes los niveles de FIX son menores del 1% en la infancia, pero en la pubertad ellos aumentan gradualmente los niveles del factor y alcanzan niveles hasta 70%; en estos pacientes, el gen del FIX solo llega a ser transcripcionalmente activo después de la pubertad bajo la influencia de la testosterona.

El tercer grupo involucra mutaciones "missense" en la secuencia del propéptido del FIX, resultando en una marcada disminución de la afinidad del factor anormal por la carboxilisa dependiente de vitamina K. Estos pacientes tienen niveles normales del FIX, pero debido a la marcada sensibilidad a antagonistas de la vitamina K, luego de la administración de anticoagulantes orales, desarrollan una severa reducción de FIX, que incrementa el riesgo de sangrado. Dos diferentes mutaciones del tipo "missense" en la alanina –10 han sido descritas: alanina por valina y alanina por treonina. La alanina –10 del dominio del pro-péptido, está en una posición esencial para el enlace de la carboxilasa que modifica los residuos del ácido glutámico en el dominio GLA.

2.3. Diagnóstico y clasificación

2.3.1. Diagnóstico mediante pruebas de hemostasia

La sospecha diagnóstica de hemofilia debe estar basada en una exhaustiva anamnesis y en las manifestaciones clínicas, y el diagnóstico se debe confirmar con los exámenes de laboratorio de coagulación.

En el estudio básico de la hemostasia, el tiempo de protrombina (TP) es normal, y el tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA) está prolongado. La prue-

ba de mezclas con plasma normal corrige el TTPA y la cuantificación del FVIII y FIX es la prueba diagnóstica.

El dosaje de FVIII puede realizarse de forma indirecta mediante un método coagulativo en una etapa o dos etapas o de forma directa con un método cromogénico; el de FIX generalmente se determina mediante uno coagulativo. Dependiendo de la cantidad de factor, se clasificará su grado de severidad. Ver tabla 36-1.

Las hemofilias leves se detectan a partir de un examen de hemostasia alterado en estudios preoperatorios, sangrados postquirúrgicos o en estudios familiares, a diferencia de la hemofilia grave, que se sospechan ante la presencia de hematomas espontáneos, especialmente presentes desde edades precoces; habitualmente en niños menores de 1 año de edad.

Un diagnóstico correcto es esencial para asegurar que el paciente reciba el tratamiento adecuado. Para ello es indispensable contar con el apoyo de un laboratorio que se ajuste a una serie de protocolos y procedimientos estrictos, lo que exige: conocimientos y experiencia en pruebas de coagulación de laboratorio; uso de equipos y reactivos adecuados y garantía de calidad.

La tabla 36-1 muestra una clasificación de los pacientes con hemofilia.

Tabla 36-1. Clasificación de la hemofilia

Tipo	Niveles de Factor	Manifestaciones clínicas
Grave	<1%	Hemorragias espontáneas o por traumatismos mínimos
Moderada	1-5%	Hemorragias por traumatismos leves o moderados
Leve	5% - 40%	Sangrado postquirúrgico o frente a traumas mayores

2.3.2. Diagnóstico precoz en pacientes con antecedentes familiares:

Se aconseja obtener sangre del cordón umbilical y determinar el nivel de FVIII/FIX en caso de neonatos masculinos de madres portadoras o con posibilidad de serlo. El diagnóstico de hemofilia B leve puede ser dificultoso por los niveles normalmente disminuidos de FIX en los neonatos (que se normalizan alrededor del sexto mes).

2.3.3. Diagnóstico molecular:

Constituye el método para identificar la mutación responsable de la hemofilia y es el método recomendado para detección de portadoras.

2.3.4. Diagnóstico prenatal:

Es posible realizar un diagnóstico prenatal por medio del estudio genético de una biopsia de vellosidades coriónicas entre las semanas 9 y 11 de gestación, o de amniocentesis (alrededor de la semana 20 de gestación). Es preciso conocer la mutación de la familia con anterioridad para poder realizar el estudio. También, en algunos casos, es posible realizar el estudio genético (preimplantatorio) en embriones.

2.4. Cuadro clínico y manejo

2.4.1. Conceptos generales

La expresión clínica de la hemofilia es la hemorragia en diversas localizaciones del organismo, siendo las más características y frecuentes las de articulaciones y músculos. Las articulaciones más afectadas son los tobillos, rodillas y codos. Las hemartrosis repetidas originan una patología característica denominada artropatía hemofílica que provoca una severa limitación de la función articular y dolor crónico. El objetivo primario del tratamiento es la prevención de su desarrollo.

En las siguientes situaciones clínicas se debe considerar el diagnóstico de hemofilia:

- Neonatos: con presencia de hematomas musculares en los sitios de administración de vitamina K o vacunas, hemorragia intracraneal, cefalohematoma, hematomas en sitios de venopunción, etc.

- Niños: el inicio de la deambulación (menos frecuentemente el gateo) puede originar hematomas glúteos, subcutáneos en piernas, hemartrosis en tobillos o rodillas en pacientes con hemofilia grave. El corte del frenillo o del labio superior (traumático) suele ser otra localización habitual de hemorragia persistente en estos pacientes.

El primer episodio bien tratado condiciona la evolución y el pronóstico posterior y se evitan complicaciones y secuelas permanentes, por lo que ante la duda siempre debe aplicarse terapia de remplazo (TR) y/o terapia asociada (TA), frío y/o compresión de forma precoz.

2.4.2. Hemorragias graves con riesgo vital inmediato

Sistema nervioso central. La hemorragia intracraneana es responsable de hasta el 70% de las muertes en los pacientes con hemofilia.

En caso de traumatismos de cráneo y/o síntomas/signos sugestivos de hemorragia en SNC administrar el factor de inmediato. Luego solicitar estudio por imágenes. En presencia de hemorragia en SNC continuar con factor durante al menos 15 días (nivel 80-100% inicial, luego >50%).

Cuello, garganta, amígdalas (vía aérea superior). Hospitalizar al paciente, puede ser necesaria la intubación orotraqueal para mantener permeable la vía aérea. Nivel de Factor objetivo inicial entre 80-100%, luego >50%. Continuar tratamiento sustitutivo diario hasta resolución del cuadro.

Digestivo y abdomen. El abdomen per se presenta grandes dificultades por los diagnósticos diferenciales, porque presentan clínica y exámenes complementarios similares con la patología abdominal habitual. Por ejemplo, la hemorragia que afecta al músculo psoas ilíaco (Hematoma del Psoas) tienen como diagnóstico diferencial cuadros de abdomen agudo como apendicitis aguda, hemartrosis coxofemoral, hematoma renal o patología de la vía urinaria. Nivel de Factor objetivo inicial > 80%, luego dosis de mantención >50%.

2.4.3. Hemorragias sin riesgo vital inmediato

Hemartrosis. Las hemartrosis son la primera causa de consulta, conlleva dolor exquisito, progresivo e invalidante. Es la causa de graves deformaciones músculo-esqueléticas y consiguiente severo daño e impacto psicosocial. Es imprescindible tener presente que solo basta la declaración del paciente que siente dolor, situación conocida como “aura” para que exista una hemartrosis incipiente que debe ser tratada inmediatamente.

Se aconseja elevar el nivel del factor al 30% con los primeros síntomas o después del trauma. Para una hemorragia articular más significativa, elevar el nivel al 50-60%. Continuar tratamiento hasta que los síntomas hayan mejorado significativamente e idealmente evidencia de resolución en imágenes. Repetir la dosis cada 12-24 horas o cada 24-72 horas. En algunas ocasiones, la evolución tórpida de la hemartrosis puede determinar la necesidad de prolongar el tratamiento sustitutivo. Medidas adyuvantes: hielo local intermitente (15 minutos cada 2-3 horas), reposo temporal y analgésicos. Movilizar la articulación tan pronto como sea posible, cuando el dolor haya mejorado. Completar con fisioterapia de rehabilitación.

No se recomienda la artrocentesis de rutina. Se puede considerar realizarla en el caso de: hemartrosis a tensión que no muestra signos de mejoría con el tratamiento conservador; evidencia de compromiso neurovascular en la extremidad; presencia de fiebre o ante sospecha de artritis séptica. Se debe considerar la presencia de inhibidores como posible causa de persistencia de sangrado a pesar de la terapia adecuada de reemplazo de factor.

Hematomas. Los hematomas son la segunda causa de consulta. si son superficiales o pequeños, elevar el nivel de factor al 30-50% con los primeros síntomas

o inmediatamente después del trauma. Según la severidad de la hemorragia se continuará el tratamiento sustitutivo, así como las medidas adyuvantes. En caso de hematomas en miembros superiores o inferiores, se deberá evaluar el compromiso neurovascular. En presencia de un hematoma profundo o extenso, o en presencia de un síndrome compartimental, se recomienda internar al paciente, administrar de inmediato dosis de factor que mantenga niveles plasmáticos superiores al 50%, durante al menos 7 días. Evitar todo procedimiento quirúrgico y/o invasivo. Completar tratamiento con fisioterapia.

Hematuria. En el 90% de los casos es un proceso benigno autolimitado y raramente pone en peligro la vida del paciente, excepto que existan fenómenos asociados. Indicar abundante hidratación (3 L/m2) durante 48-72 horas y reposo. Evaluar causas de hematuria (infección, litiasis, traumatismo, tumor, etc.). Si persiste (por más de 72-96 hs), elevar el nivel del factor a ≥30%.

Tener en cuenta que la administración del factor puede llevar a la formación de coágulos en la vía urinaria. En presencia de dolor tipo cólico utilizar analgésicos y antiespasmódicos. No usar antifibrinolíticos.

Epistaxis. En algunos casos es suficiente la aplicación de un taponaje adecuado y la administración de antifibrinolíticos. Aplicar presión firme en la parte blanda de la nariz durante al menos 20 minutos. Si continúa el cuadro clínico administrar tratamiento sustitutivo con factor (nivel >30%).

2.5. TRATAMIENTO DE PACIENTES CON HEMOFILIA SIN INHIBIDOR

2.5.1. Terapia de reemplazo (TR)

Corresponde a la adminsitracón de concentrados de factor de coagulación VIII ó IX, y se denomina “terapia sustitutiva”.

- Concentrados de FVIII y FIX fraccionados del plasma: el procesamiento actual y las técnicas de inactivación viral han disminuido significativamente el riesgo de infecciones por lo que se consideran altamente seguros.
- Concentrados recombinantes de FVIII y FIX de vida media estándar (SHL, por sus siglas en inglés “standard half life”) y de vida media extendida (EHL, por sus siglas en inglés “extended half life”). El intervalo de las dosis de los EHL depende de la farmacocinética de cada producto.

Otros productos del plasma:

- Crioprecipitados (CP): No se recomienda su uso y solo puede justificarse en situaciones en las que los concentrados de FVIII no estén disponibles. (1 bolsa de CP: ≥80 UI de FVIII)
- Plasma fresco congelado (PFC): No se recomienda su uso y solo puede justificarse en situaciones en las que los concentrados de FIX no estén disponibles.

La terapia de reemplazo puede ser administrada en dos modalidades:

- Demanda: administración de los concentrados solo ante la aparición de un evento hemorrágico.
- Profilaxis: regular administración de agentes hemostáticos para disminuir o evitar la presencia de hemorragias en todo momento, disminuyendo el riesgo de desarrollar complicaciones hemorrágicas, y mejorando la calidad de vida.

2.5.2. Cálculo de dosis del factor a administrar

En la TR, que corresponde a la reposición temporal del factor deficiente, las dosis y posología de administración está en relación con la gravedad del cuadro hemorragíparo.

La cantidad de unidades a administrar es un cálculo sencillo, en que necesita conocer el tipo de hemofilia, el porcentaje en que se desea aumentar la cantidad de factor *in situ* y el peso del paciente.

Cálculo de dosis:
- FVIII (UI): peso (kg) x nivel deseado x 0,5
- FIX (UI): peso (kg) x nivel deseado. (Si se utiliza FIX recombinante de SHL, la dosis debería multiplicarse por 1,2 en adultos y 1,5 en niños)

A continuación un ejemplo de cómo hacer el cálculo de la cantidad de factor necesaria:
- Paciente con Hemofilia A leve (FVIII: 15%)
- Peso = 80 kg
- Porcentaje de aumento deseado = 40%
- Número de unidades a administrar = 80 x (40-15) x 0,5 = 1.000 UI de factor FVIII

2.5.3. Otras opciones terapéuticas

Desmopresina (DDAVP): es el tratamiento de elección para los pacientes con hemofilia A leve, cuando el FVIII puede elevarse hasta un nivel terapéutico adecuado. Dosis: 0,3 µg/kg/día en forma EV (diluida en 50-100 ml de solución fisiológica e infundida en 20-30 minutos) o subcutánea. (Se debe realizar el test de desmopresina). No debe usarse por más de 2-3 días consecutivos, por riesgo de taquifilaxia. Se debe indicar restricción hídrica para evitar hiponatremia dilucional.

Antifibrinolíticos:
- Ácido Tranexámico: es útil como terapia coadyuvante, principalmente en sangrados mucosos. Su uso está contraindicado en la hematuria. Dosis: 15-20 mg/kg cada 8 hs por vía oral (10-15 mg/kg/dosis EV cada 8 hs).
- Ácido aminocaproico: 50-100 mg/kg cada 6 horas (dosis máx 24 g/d) vía oral.

Emicizumab: anticuerpo monoclonal biespecífico que (a través de su unión al FIXa y FX) activa el FX; de administración subcutánea, para pacientes con hemofilia A con y sin inhibidor.

Dosis de carga de 3 mg/kg semanal, durante 4 semanas y luego continuar con dosis de mantenimiento de 1,5 mg/kg semana (o 3 mg/kg cada 15 días o 6 mg/kg cada 4 semanas). Existe a la fecha muy poco seguimiento a largo plazo de pacientes con esta indicación de tratamiento. Como el emicizumab difiere bioquímicamente del FVIII, se desconoce su impacto a largo plazo en la patología articular, la inmunogenicidad y el costo-beneficio en pacientes sin inhibidores.

2.6. INHIBIDORES

Los inhibidores son anticuerpos dirigidos contra el FVIII o FIX. Los pacientes que desarrollan inhibidores enfrentan un mayor riesgo de sangrado y la probabilidad de un desarrollo temprano de artropatía progresiva, junto con mayores costos relacionados con el tratamiento. Los agentes bypaseantes se pueden usar para prevenir y controlar el sangrado, (así como la profilaxis con emicizumab en pacientes con hemofilia A e inhibidor), pero la eficacia de dichos tratamientos es menos predecible que la de terapia de reemplazo de factor. El desarrollo de inhibidores es actualmente la complicación del tratamiento más significativa observada en pacientes con hemofilia. La mayoría de los inhibidores en hemofilia son de tipo I y neutralizan completamente a los factores.

El 20-30% de los pacientes con hemofilia A grave, 5-10% de los pacientes con hemofilia A leve-moderada y menos del 5% de los pacientes con hemofilia B grave desarrollan inhibidores.

Los factores de riesgo para desarrollo de inhibidor incluyen antecedentes familiares de inhibidores, ascendencia africana negra e hispana, variantes genéticas como el tipo de mutación (mayor riesgo: grandes deleciones y mutaciones sin sentido; riesgo intermedio: inversión del intrón-22 y mutaciones en el sitio de empalme), genotipo HLA y polimorfismo de genes reguladores inmunes. La exposición a factores en forma intensa y temprana (≥ 5 días) también está asociada a un incremento de riesgo de desarrollo de inhibidor. La exposición intensa también es un factor de riesgo para el desarrollo de inhibidores en algunos pacientes con hemofilia A no grave. El tipo de producto, es decir, concentrados de FVIII recombinantes vs derivados del plasma, en pacientes no previamente tratados, puede contribuir a aumentar el riesgo de desarrollo de inhibidor en pacientes con hemofilia A; sin embargo, esto continúa siendo motivo de controversia. Por otra parte, la evidencia actual indica que el cambio de producto o de marca no aumenta el riesgo de desarrollo de inhibidor.

En un paciente con hemofilia, un TTPA prolongado que no corrige con el agregado de plasma normal, constituye un importante indicio de la presencia de inhibidor. El diagnóstico de los inhibidores se deberá realizar con el método de Bethesda modificado o Nijmegen. Si el factor residual en la muestra es superior a 5%, se debe calentar la muestra a 56^{o}C, por 30 minutos, previamente. Se considera un título positivo a un valor ≥0,6 UB/ml para hemofilia A y ≥0,3 UB/ml para hemofilia B. Casi el 80% ocurre dentro de las primeras 20 exposiciones, y la mayoría dentro de las primeras 75 exposiciones. También pueden aparecer en pacientes adultos.

Los inhibidores se clasifican en inhibidores de:
- Baja respuesta: los títulos persisten por debajo de 5 UB/ml, aún después de la administración de FVIII o FIX.
- Alta respuesta: determinación del título de inhibidor ≥5 UB/ml en cualquier momento, que en general aumenta con la administración de FVIII/IX (respuesta anamnésica).

Estos pacientes pueden presentar en algún momento, títulos bajos (<5UB/ml) o negativos como consecuencia de la falta de exposición al factor. En estos casos, el uso de FVIII/FIX en altas dosis está indicado solamente cuando la hemorragia pone en riesgo la vida del paciente o en caso de una cirugía.

La determinación del título de inhibidor deberá realizarse idealmente con un período de washout (48-72 hs sin administración de factores de SHL) en las siguientes circunstancias:
- Al inicio del tratamiento sustitutivo se recomienda control frecuente, por ejemplo cada 5 DE las primeras 20 y cada 10 DE hasta las 50.
- Luego de un tratamiento intenso (≥5 días continuados) en pacientes mínimamente expuestos y en pacientes con hemofilia A leve. (Nota: 1 día de exposición (DE) es un día calendario, independiente de la cantidad de dosis de factor recibidas en esas 24 hs).
- Previo a cirugía o procedimiento invasivo.
- En caso de respuesta postoperatoria subóptima a la terapia de reemplazo ante la falta de respuesta al tratamiento habitual de una hemorragia (no es necesario el wash out).
- En caso de hemorragias recurrentes en articulaciones blanco, a pesar de la terapia de reemplazo adecuada.
  En pacientes con hemofilia B, ante la presencia de una reacción alérgica asociada a la infusión del FIX.

2.6.1. Tratamiento de pacientes con hemofilia e inhibidores

Tratamiento de inmunotolerancia. La erradicación del inhibidor es el objetivo fundamental del manejo de los pacientes con inhibidor. La inmunotolerancia (ITI) es la única estrategia terapéutica demostrada exitosa para erradicar el anticuerpo (inhibidor) dirigido contra el FVIII. Este tratamiento debería ser llevado a cabo bajo la supervisión de un Centro Integral de Tratamiento con experiencia en el manejo de inhibidores. Se sugiere iniciarla sin demora desde el diagnóstico de inhibidor, siempre y cuando sea posible.

Esquema inicial:
- Pacientes con inhibidor de baja respuesta: FVIII (SHL) 20 a 50 UI/kg 3 veces por semana o días alternos. Aumentar dosis y/o disminuir intervalos de aplicación si presenta sangrados frecuentes.
- Pacientes con inhibidor de alta respuesta: En pacientes de buen pronóstico se puede optar por un esquema de FVIII 50-100 UI/kg 3 veces por semana. También se podría utilizar esquema de altas dosis. En pacientes de mal pronóstico utilizar esquemas de alta dosis (FVIII 100 a 200 UI/kg/día).

El título de inhibidor debe ser evaluado 1 vez por mes. Entre el primer y tercer mes de inicio de la ITI se detecta el pico máximo del título. Si se observa una tendencia descendente, con descenso de al menos el 20% del título a los 6 meses del pico alcanzado en la ITI, se debe continuar con el mismo esquema. El estado de las articulaciones y el fenotipo de sangrado también deben evaluarse mensualmente y se debe considerar el aumento de dosis o de la frecuencia de administración de factor si estos se ven afectados.

Tratamiento de eventos hemorrágicos en pacientes con hemofilia e inhibidor. Los agentes bypaseantes disponibles son:

- Concentrado de complejo protrombínico activado (CCPa): producto derivado plasmático; contiene FII, IX y X no activados y VII activado; contiene trazas de FVIII. Puede provocar reacciones alérgicas en pacientes con hemofilia B y aumentar el título de inhibidor (respuesta anamnésica) hasta en un 30% de los pacientes con hemofilia A. Dosis máxima: 100 UI/kg. Dosis máxima diaria: 200 UI/kg.
- FVII activado recombinante (rFVIIa): producto recombinante; no produce respuesta anamnésica.

Si bien la eficacia de ambos agentes ha sido ampliamente demostrada, está asociada a significativas variaciones intra e interindividuales y su eficacia es impredecible.

Profilaxis en pacientes con hemofilia e inhibidor. Para pacientes con hemofilia A grave no candidatos a ITI o con fracaso a la misma y que presenten sangrados frecuentes o hemorragias mayores se recomienda profilaxis con emicizumab sobre la profilaxis con agentes bypaseantes. Además, la profilaxis con emicizumab puede ser indicada para posponer el inicio de la ITI, por ej. en pacientes con inadecuados accesos venosos.

En pacientes con hemofilia B y sangrados frecuentes o severos podría considerarse profilaxis con rFVIIa o CCPa (en ausencia de reacciones alérgicas al FIX).

Emicizumab: se utiliza en pacientes con hemofilia A. La dosis de profilaxis es la misma que para pacientes sin inhibidor.
Recomendaciones de uso en pacientes con inhibidor:

- Los bypaseantes deben suspenderse al menos 48 horas antes de comenzar la profilaxis con emicizumab.
- El título de inhibidor debe verificarse antes de iniciar el emicizumab.
- No se dispone de datos en pacientes menores de 1 año de edad.
- El dosaje de FVIII y el título de inhibidor se realiza utilizando el método cromogénico con reactivo bovino.

Bypaseantes (dosis profilaxis):

- rFVIIa 90 µg/kg/día, o días alternos, o 90-270 µg/kg trisemanal.
- CCPa 85 UI/kg (± 15%) trisemanal

3. ALTERACIONES HEREDITARIAS DE LOS FACTORES DE LA COAGULACIÓN

Aunque con menos frecuencia que las hemofilias, también se puede presentar déficit o alteración funcional de los siguientes factores: fibrinógeno, factor XIII, protrombina, factor V, factor VII, factor X, factor XI, factor XII, precalicreína y kininógeno de alto peso molecular. Respresentando el 3-5% de todas las deficiencias hereditarias de la coagulación. Estas alteraciones son descritas brevemente a continuación.

3.1. Alteraciones del fibrinógeno

Las alteraciones del fibrinógeno pueden ser cuantitativas o cualitativas. Las primeras incluyen ausencia de fibrinógeno (afibrinogenemia) o disminución de su concentración plasmática (hipofibrinogenemia). Las alteraciones cualitativas se refieren a alteraciones funcionales del fibrinógeno (disfibrinogenemia). La estructura molecular del fibrinógeno fue descrita en el capítulo 20.

3.1.1. Afibrinogenemia

Los desórdenes congénitos del fibrinógeno se deben a alteraciones en el cromosoma 4 (q26-q28) donde se localiza el gen. Prevalencia 1:1.000.000. Los heterocigotos presentan hipofibrinogenemia y los homocigotos afibrinogenemia. El diagnóstico se realiza precozmente cuando se presenta sangrado prolongado en el muñón umbilical. Las manifestaciones clínicas incluyen hemorragia gastrointestinal y de mucosas. También se ha observado un incremento en la incidencia de abortos durante el primer trimestre de gestación y hemorragia postparto. Además, en un 20% de pacientes con afibrinogenemia se observa hemartrosis, pero no con la intensidad que se presenta en los pacientes con hemofilia.

Los pacientes con afibrinogenemia, hipofibrinogenemia o disfibrinogenemia, presentan prolongación del TP, TTPA y TT.

Nivel Hemostático 50 mg/dl, reposición con concentrado de fibrinógeno, crioprecipidado o PFC.

3.1.2. Disfibrinogenemia

A partir de 1965, se han descrito alrededor de 200 familias que representan disfibrinogenemia. La forma hereditaria es causada por mutaciones en los genes que codifican para las cadenas Aα, Bβ ó γ del fibrinógeno. Las disfibrinogenemias son denominadas según la ciudad de origen de los pacientes, o la ciudad del hospital donde el paciente fue estudiado. Si hay más de una disfibrinogenemia diferente de la misma ciudad se agrega un número romano después del nombre de la ciudad. El término hipodisfibrinogenemia es usado cuando la disfibrinogenemia heredada se asocia con disminución de fibrinógeno en el plasma. Aproximadamente se han informado 240 alteraciones en el gen fibrinógeno.

Las alteraciones de la molécula del fibrinógeno se expresan en la mayoría de los pasos de formación y estabilización de fibrina. El defecto más común es la alteración en la polimerización de fibrina. En algunos pacientes el coágulo de fibrina es resistente a la fibrinolisis, por lo que en ellos se presenta tendencia a la trombosis. El modelo de herencia es casi siempre autosómico dominante. Un poco más de la mitad de los pacientes no presenta sangrado o trombosis, mientras que el 25% presenta sangrados y 20% trombosis. La trombosis resulta de una falla en la fibrina para unir plasminógeno o t-PA. Las manifestaciones de sangrado incluyen epistaxis, equimosis, menorragia, hematomas, hemartrosis, sangrado postoperatorio y sangrado postparto. La mayoría de los episodios de sangrado son leves o moderados. Las manifestaciones trombóticas incluyen trombosis venosa profunda, tromboflebitis, embolia pulmonar y trombosis arterial.

Entre las pruebas de "screening", el TP es más sensible que el PTT para pesquisar disfibrinogenemia con tendencia al sangrado. La concentración de fibrinógeno plasmático puede ser baja o normal.

La disfibrinogenemia adquirida se puede presentar en pacientes con enfermedad hepática grave o también puede estar asociada a neoplasias y en enfermedades autoinmunes.

Como prueba de confirmación, junto al TT se debe cuantificar el fibrinógeno como antígeno (ELISA u otro método).

Las hemorragias pueden ser manejadas con concentrados de finbrinógeno, transfusiones de plasma y crioprecipitado.

3.2. Déficit de factor XIII

A partir de 1944 en que se describió el déficit del factor estabilizador de fibrina (factor XIII) se han descrito mas de 200 casos. Este déficit es un trastorno raro (1:2.000.000), transmitido como un rasgo autosómico recesivo.

El factor XIII está presente en plasma y plaquetas; aproximadamente 50% de su actividad está en las plaquetas. Está formado por 2 sub-unidades distintas, A y B. La subunidad A es sintetizada en los megacariocitos, monocitos y macrófagos, y su gen se encuentra en el cromosoma 6p24-25. La subunidad B no catalítica estabiliza la subunidad A y es sintetizada por los hepatocitos; es codificada en el cromosoma 1q31-32.

La actividad catalítica responsable de la formación de enlaces covalentes en la fibrina es la subunidad A en el plasma. Existen 3 formas distintas de deficiencia de factor XIII, basado en si la subunidad A y subunidad B están presentes o ausentes: (a) deficiencia tipo I: la concentración ambas subunidades está disminuida, (b) deficiencia tipo II: la subunidad A ausente y la subunidad B presente, y (c) deficiencia tipo III: existe deficiencia selectiva de la subunidad B.

Como esta deficiencia es autosómica recesiva, solo los homocigotos son clínicamente sintomáticos. Los homocigotos que han sido descritos en literatura con frecuencia son niños de enlaces consanguíneos.

Se han descrito mutaciones y deleciones en los genes que codifican para ambas subunidades, aunque con mayor frecuencia en el gen que codifica para la subunidad A.

Generalmente los pacientes presentan niveles plasmáticos de factor XIII <1%. El estado homocigoto se caracteriza por sangrado grave del cordón umbilical, hemorragia intracraneal, cicatrización anormal y abortos espontáneos recurrentes.

Se ha descrito déficit adquirido de factor XIII asociado al desarrollo de anticuerpos anti-factor XIII, en pacientes en los que se han indicado ciertos medicamentos (dilatin, isoniazidas, penicilina), y en pacientes con gammapatía monoclonal, con púrpura de Henoch-Schölein, enfermedad hepática, enfermedad de Chron y colitis ulcerativa.

La sensibilidad del coágulo de fibrina en urea 5M es la prueba de laboratorio más usada; los coágulos formados en ausencia de factor XIII se disuelven rápidamente en urea; (normal: alrededor de 24 horas). Sin embargo, el ensayo más sensible es medir la estabilidad de la unión covalente del coágulo de fibrina. También se utilizan pruebas de base inmunológica como ELISAs específicos para cada subunidad del factor XIII.

Como tratamiento, en estos pacientes se utiliza terapia de reemplazo con concentrado de FXIII, o transfusiones (plasma fresco o crioprecipitado).

3.3. Déficit de protrombina

El primer caso de hipoprotrombinemia fue descrito en 1969. Se ha descrito una prevalencia 1:2.000.000; se trata de un desorden autosómico recesivo. El gen que codifica para protrombina se localiza en el cromosoma 11.

Clínicamente se manifiesta como síndrome hemorragíparo; la hemorragia espontánea es infrecuente y el sangrado post-traumático es común. El sangrado por el muñón del cordón umbilical es frecuente en los recién nacidos afectados. También se ha descrito hemartrosis, epistaxis, menstruación aumentada y sangrado postparto.

Se han descrito 2 variantes de hipoprotrombinemia: disprotrombinemia, e hipoprotrombinemia propiamente tal; esta última parece ser más común.

En los casos de disprotrombinemia heterocigota se encuentra protrombina normal y anormal en el plasma (protrombina de Cardeza y Papua); la protrombina Barcelona, cuyos portadores son homocigotos, se caracteriza por la sustitución de cisteína por arginina en el residuo 273.

El "screening" de hemostasia se caracteriza por TS normal, TTPA y TP prolongado, y TT normal. El diagnóstico requiere estudio del factor II por pruebas de coagulación (estudio funcional) y con pruebas de base inmunoquímica (ej. ELISA).

Como tratamiento se utiliza plasma fresco congelado o con concentrados de complejo de protrombina. Se agrega vitamina K en caso de que el problema de la deficiencia sea esta vitamina.

3.4. Déficit de factor V

La deficiencia hereditaria de factor V es una enfermedad infrecuente, con una prevalencia de 1:1.000.000 de personas. Se ha descrito en varias partes del mundo y es transmitida como un rasgo autosómico recesivo. Se manifiesta clínicamente solo en pacientes homocigotos.

La deficiencia de factor V se expresa como un síndrome hemorragíparo. Los trastornos hemorrágicos incluyen: (a) Déficit verdadero de factor V en homocigotos y heterocigotos; y (b) carencia de factor V y factor VIII combinado.

El factor V Quebec ha sido descrito como un desorden de sangrado de herencia autosómica dominante y presenta sangrados graves después de traumatismos. Al parecer forma parte de un trastorno en que las diferentes proteínas de los gránulos alfa de las plaquetas sufren degradación.

Otras mutaciones asociadas a deficiencia de factor V, son las siguientes: (a) Y1702C, causa frecuente de deficiencia de FV en la población italiana, (b) factor V Stanford, mutación que causa la pérdida de un sitio de activación por trombina (R1545V) y la terminación prematura de traducción en el aminoácido 1560, y (c) factor V New Brunswick, cuya mutación en Ala221Val interfiere con la estabilidad del factor V a 37°C.

Los pacientes experimentan epistaxis espontánea, menorragia, y excesivo sangrado después de extracciones dentales o de procedimientos quirúrgicos.

Los pacientes presentan TS normal, TTPA y PT levemente prolongado, y TT normal.

Como tratamiento se utiliza plasma fresco congelado.

3.5. Déficit de factor VII

Se han descrito una prevalencia de 1:500.000. La condición es heredada como un rasgo autosómico recesivo. Producen deficiencias marcadas en homocigotos y moderadas, usualmente sin manifestaciones clínicas, en heterocigotos.

El factor VII es sintetizado principalmente en el hígado y circula en el plasma en una concentración de aproximadamente 0.5 g/mL. El gen que lo codifica está localizado en el cromosoma 13 (13q34); consiste en 9 exones. Codifica

una proteína madura de 406 aminoácidos, que tiene un dominio terminal (Gla) modificado por carboxilación de residuos de ácido glutámico, dos dominios con homología al factor de crecimiento epidérmico (EGF1 y 2), y un C-terminal con dominio serino-proteasa.

La ausencia total de factor VII en el plasma, por lo general es incompatible con la vida, y los individuos mueren un poco después del nacimiento debido a hemorragia grave. Se han descrito varios polimorfismos en el gen factor VII y algunos han mostrado relación con niveles plasmáticos factor VII. Se han descrito alteraciones cualitativas y cuantitativas del factor VII.

Entre las manifestaciones clínicas se incluyen: epistaxis espontánea, hematomas subcutáneos, hemorragias genitourinarias y gastrointestinales, y hemartrosis. Hemorragia en el sistema nervioso se puede presentar en el periodo neonatal.

Estos pacientes presentan TS normal, TTPA normal, TP prolongado y TT normal. Su deficiencia se confirma con pruebas factor específico.

El déficit adquirido de factor VII (déficit de vitamina K, enfermedad hepática, terapia con anticoagulantes orales) debe ser considerado antes de hacer diagnóstico de deficiencia hereditaria.

En el tratamiento de estos pacientes se utiliza FVII recombinante o plasma fresco.

3.6. Déficit de factor X

La prevalencia de esta enfermedad es de 1:1.000.000 personas. Se hereda como rasgo autosómico recesivo incompleto y las alteraciones genéticas y manifestaciones clínicas son semejantes a las del déficit de factor VII.

El gen que codifica el factor X, al igual que para el factor VII, se encuentra en el brazo largo de cromosoma 13. El gen consiste en ocho exones, cada uno codifica un dominio específico funcional dentro de la proteína. Tanto la estructura génica como la secuencia aminoacídica muestran la homología con otros factores de coagulación dependientes de vitamina K.

Los pacientes con esta deficiencia presentan sangrado nasal, hemartrosis, hematomas y sangrado de mucosas.

En el laboratorio se observa prolongación del PT y TTPA. El TT es normal y el TS se presenta prolongado en algunos pacientes.

El tratamiento utilizado es el reemplazo del factor X con plasma fresco congelado o con concentrados de complejo de protrombina.

3.7. Déficit de factor XI

El déficit de factor XI se transmite como rasgo autosómico recesivo incompleto. La prevalencia se estima en 1:1.000.000 de personas. Una mayor frecuencia de este desorden se observa en personas de ascendencia judía, con una frecuencia estimada de 5-11% en los judíos Ashkenazi.

Esta enfermedad se manifiesta en homocigotos o dobles heterocigotos con síntomas hemorrágicos moderados, generalmente secundarios a traumatismos y heridas.

Se han descrito 3 tipos de mutaciones: (a) mutación tipo I, resulta en una interrupción del "splicing"; (b) mutación tipo II, resulta en un codon "stop" y en la obtención de una molécula no funcional y (c) mutación tipo III, resulta en una substitución de aminoácidos y obtención de una molécula disfuncional.

Los pacientes con mutación del tipo II presentan una gran tendencia al sangrado. Las mutaciones tipo II y III son comunes en judíos Ashkenazi. En general todas las mutaciones del factor XI resultan en una disminución de la proteína proporcional a la actividad coagulante de factor XI. La mayoría de las mutaciones se encuentran en los exones 9 y 10.

La deficiencia del factor XI produce manifestaciones hemorrágicas, después de intervenciones quirúrgicas o traumatismos; el sangrado espontáneo es muy raro. Son infrecuentes la hemartrosis, el sangrado retroperitoneal y craneal. Otras manifestaciones hemorrágicas espontáneas como menorragia, gingivorragia o epistaxis, pueden presentarse ocasionalmente.

El diagnóstico de la deficiencia del factor XI se puede realizar en tres situaciones: (a) a partir del estudio clínico de pacientes con tendencia hemorrágica, (b) en la evaluación de un TTPA prolongado, y (c) en el estudio familiar de un paciente con diagnóstico de déficit de factor XI. Pruebas de factor específico se deben utilizar en el diagnóstico.

El tratamiento incluye concentrado de factor XI, transfusión de plasma fresco congelado, fármacos antifibrinolíticos.

3.8. Déficit de factor XII

La deficiencia de factor XII es heredada como un rasgo autosómico recesivo. Esta deficiencia ha sido identificada en 1.5 - 3% de los donantes de sangre. Generalmente no se asocia con manifestaciones hemorrágicas.

En el laboratorio se caracteriza por TTPA prolongado. Se requiere de pruebas factor específico para el diagnóstico.

3.9. Déficit de precalicreína

La deficiencia de precalicreína, aparentemente, es heredada como un rasgo autosómico recesivo, sin embargo la información genética es insuficiente. La mayor parte de pacientes son negros y la incidencia de consanguinidad es importante. Los heterocigotos con aproximadamente el 50% del nivel plasmático normal pueden ser pesquisados. En la mayoría de los casos se ha observado ausencia de precalicreína.

Se ha pesquisado alteraciones en la fibrinolisis, quimiotaxis, respuesta inflamatoria. La importancia clínica del déficit de precalicreína es desconocida.

El déficit de precalicreína se expresa en una moderada prolongación del TTPA. El TP y TS son normales. El tiempo de lisis euglobulina se presenta prolongado. La alteración se caracteriza por una activación anormalmente lenta de la fase de contacto.

3.10. Déficit de kininógeno de alto peso molecular (HMWK)

Esta deficiencia se hereda como un rasgo autonómico recesivo. Estudios inmunológicos revelan la ausencia de kininógeno en los homocigotos, y 50% del nivel normal en los heterocigotos. Este defecto no se asocia con sangrado excesivo ni con trombosis.

En el laboratorio se manifiesta con prolongación del TTPA. El tiempo de lisis de euglobina está prolongado.

3.11. Deficiencia de α_2 antiplasmina

Sangrado importante incluyendo hemartrosis, fue asociado con deficiencia de α_2 antiplasmina. Esta alteración se hereda como rasgo autonómico recesivo, en el cual los heterocigotos tienen deficiencias detectables de esta antiproteasa, pero solo la mitad sangra.

El sangrado presumiblemente es el resultado de lisis prematura del tapón hemostático causando una regularidad en la actividad de plasmina.

4. LECTURAS SUGERIDAS

Hemofilias

Giancarlo Castaman, Davide Matino. Hemophilia A and B: molecular and clinical similarities and differences. Haematologica. 104(9):1702-1709, 2019.

Potgieter, J.J., Damgaard, M. y Hillarp, A. One-stage vs. chromogenic assays in haemophilia A. Eur J Haematol, 94: 38-44, 2015.

Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, et al. WFH Guidelines for the Management of Hemophilia, 3rd edition. Haemophilia. 26 (Suppl 6): 1-158, 2020.

Ministerio de Salud de Chile. Guía clínica hemofilia. Santiago; MINSAL, 2013.

Jiménez V., Villar A., Quintana, M., Gaco, J., Hernández F. "Estandarización de la titulación de FVIII:C" *Haematologica* (ed. Esp.), 87, supl. 1, 2002.

Carcao M, Re W, Ewenstein B. The role of previously untreated patient studies in understanding the development of FVIII inhibitors. Haemophilia, 22(1):22-31, 2016.

Ar MC, Balkan C, Kavaklı K. Turk J Haematol. Extended Half-Life Coagulation Factors: A New Era in the Management of Hemophilia Patients, 36(3):141-154, 2019.

Castaman G, Santoro C, Coppola A, et al. Emergency management in patients with haemophilia A and inhibitors on prophylaxis with emicizumab: AICE practical guidance in collaboration with SIBioC, SIMEU, SIMEUP, SIPMeL and SISET. Blood Transfus. ,18(2):143-151, 2020.

Susen S, Gruel Y, Godier A, Harroche A, Chambost H, Lasne D, Rauch A, Roullet S, Fontana P, Goudemand J, de Maistre E, Chamouard V, Wibaut B, Albaladejo P, Négrier C. Management of bleeding and invasive procedures in haemophilia A patients with inhibitor treated with emicizumab (Hemlibra(®)): Proposals from the French network on inherited bleeding disorders (MHEMO), the French Reference Centre on Haemophilia, in collaboration with the French Working Group on Perioperative Haemostasis (GIHP). Haemophilia, 25(5):731-737, 2019.

Ljung R., Auerswald G., Benson G., Dolan G., Duffy A., Hermans C., Jiménez-Yuste V., Lambert T.,Morfini M., Zupančić-Šalek S., Santagostino E. Inhibitors in haemophilia A and B: Management of bleeds, inhibitor eradication and strategies for difficult-totreat patients. Eur J Haematol.,102(2):111-122, 2019.

Santagostino E, Young G, Escuriola Ettingshausen C, Jiménez-Yuste V, Carcao M. Inhibitors: A Need for Eradication? Acta Haematol.,141(3):151-155, 2019.

Batsuli G, Zimowski KL, Tickle K, Meeks SL, Sidonio RF Jr. Haemophilia. Immune tolerance induction in paediatric patients with haemophilia A and inhibitors receiving emicizumab prophylaxis. Batsuli G, Zimowski KL, Tickle K, Meeks SL, Sidonio RF Jr. Haemophilia, (5):789-796, 2019.

Martin K, Key N. How I treat patients with inherited bleeding disorders who need anticoagulant therapy. Blood,128 (2):178–184, 2016.

Fundación de la Hemofilia. Guía para el manejo de la Hemofilia Congénita, tercera edición. Argentina. 2021.

Otras alteraciones hereditarias de la coagulación

Hayward CPM. How I investigate for bleeding disorders. Int J Lab Hematol.;40 Suppl 1:6-14, 2018.

Peyvandi F, Palla R, Menegatti M, Mannucci PM. Introduction. Rare bleeding disorders: general aspects of clinical features, diagnosis, and management. Semin Thromb Hemost., 35(4):349-55, 2009.

Hayward CP, Moffat KA. Laboratory testing for bleeding disorders: strategic uses of high and low-yield tests. Int J Lab Hematol; 35: 322- 333, 2013.

Al-Sharif, F.Z., Aljurf, M.D., Al-Momen, A.M., Ajlan, A.M., Musa, M.O., Al-Nounou, R.M., Al-Mohareb, F.I., Alomar, H.M., Zaidi, Z.Z., Al-Zahrani, H.A. "Clinical and laboratory features of congenital factor XIII deficiency". *Saudi Med J.*; 23(5):552-4, 2002.

Kravtsov, D.V, Wu, W., Meijers, J.C, Sun, M.F, Blinder, M.A., Dang, T.P, Wang, H., Gailani, D. "Dominant factor XI deficiency caused by mutations in the factor XI catalytic domain". *Blood*:10-3530, 2003.

Tamary, H., Fromovich-Amit, Y., Shalmon, L., Zaizov1, R., Yaniv, I., Klar, A. "Molecular characterization of four novel mutations causing factor VII", *Hematology Journal* 1, 382-38, 2000.

García, J.R., Sánchez, M., Fernández, P.D., López, F., Moreno, F. "Estudio familiar de déficit de factor XI. Tratamiento profiláctico prequirúrgico con desmopresina y antifibrinolíticos". *Anales de Pediatría.* 57 (04); 373 – 3, 2002.

McVey, J.H., Boswell, E., Mumford, A.D., Kemball-Cook, G., Tuddenham, E.G. "Factor VII deficiency and the FVII mutation database". *Hum Mutat.*;17(1):3-17, 2001.

Pinotti M., Monti, M., Baroni, M., Marchetti, G., Bernardi, F. "Molecular characterization of factor X deficiency associated with borderline plasma factor X level", *Haematologica;* 89:501-502, 2004.

Van Wijk, R., Nieuwenhuis, K., Van den Berg, M., Huizinga E.G., Van der Meijden, BB., Kraaijenhagen, RJ. and Van Solinge, WW. "Five novel mutations in the gene for human blood coagulation factor V associated with type I factor V deficiency". *Blood,* 98, (2): 358-367, 2001.

Capítulo

37

ALTERACIONES HEMORRAGÍPARAS ADQUIRIDAS DE LA COAGULACIÓN

Paola Turcatti, Natalia Neira, Cecilia Guillermo

Resumen

1. Introducción

2. Coagulación Intravascular Diseminada (CID)
2.1. Definición
2.2. Condiciones clínicas asociadas al desarrollo de CID
2.3. Fisopatología
2.4. Características clínicas
2.5. Laboratorio
2.6. Criterios diagnósticos
2.7. Tratamiento
2.8. Conclusiones

3. Deficiencia de vitamina K

3.1. Causas de deficiencia de vitamina K
3.2. Diagnóstico
3.3. Tratamiento

4. Hemostasis en enfermedades hepáticas

4.1. Alteraciones hemostáticas en la enfermedad hepática
4.2. Pruebas de laboratorio y sus limitaciones
4.3. Prevención y tratamiento

5. Inhibidores adquiridos específicos de factores de la coagulación

5.1. Inhibidores de factor VIII
  5.1.1. Epidemiología
  5.1.2. Fisiopatología
  5.1.3. Clínica
  5.1.4. Laboratorio
  5.1.5. Tratamiento
5.2. Otros inhibidores específicos menos frecuentes.

6. Lecturas sugeridas

RESUMEN

Los trastornos hemorragíparos adquiridos de la coagulación son diversos y pueden estar asociados a enfermedades sistémicas o a la presencia de anticuerpos que inhiben específicamente a uno o varios factores de coagulación.

En este capítulo se describirán las características fundamentales de los principales trastornos de la coagulación que generan estas alteraciones hemorrrágicas adquiridas, como son: coagulación intravascular diseminada (CID), deficiencia de vitamina K, alteraciones hemostáticas en enfermedades hepáticas, y los inhibidores adquiridos de la coagulación.

Para mejor comprensión de este capítulo se requiere conocimiento previo de los sistemas de la coagulación y sistemas fibrinolítico, aspectos de hemostasia primaria y pruebas de laboratorio de hemostasia.

1. INTRODUCCIÓN

Los desórdenes adquiridos de la coagulación corresponden a diferentes tipos de trastornos de la hemostasia, que pueden estar asociados a enfermedades sistémicas o a la presencia de anticuerpos que actúan como inhibidores de los factores de la coagulación. Considerando su relevancia clínica y la gravedad que involucran, los desórdenes adquiridos más importantes son la coagulación intravascular diseminada (CID) y los trastornos secundarios a la enfermedad hepática.

La deficiencia de la vitamina K es otra posible causa de estas alteraciones, la cual se produce fundamentalmente en el contexto de anticoagulación con antagonistas de esta vitamina.

Los inhibidores específicos de la coagulación son menos conocidos por tener una menor incidencia clínica, sin embargo cuando están presentes pueden ocasionar cuadros hemorrágicos graves.

En este capítulo se abordarán los aspectos fundamentales considerando la etiología, fisiopatología, presentación clínica, características de laboratorio y lineamientos generales de tratamiento de cada una de estas entidades.

2. COAGULACIÓN INTRAVASCULAR DISEMINADA

2.1. Definición

La CID es un trastorno trombo-hemorrágico sistémico, secundario a una condición clínica subyacente caracterizada por la activación de la coagulación intra-

vascular con formación de fibrina acompañado de fibrinólisis secundaria. Este es un desorden complejo de la coagulación con una fisiopatología variable y dependiente en gran medida del evento que lo desencadena; condicionando una variabilidad clínica y de laboratorio que hacen de este cuadro una situación de difícil diagnóstico y manejo por lo que es objeto de estudio e investigación continua.

El desarrollo de una CID se acompaña de alteraciones de laboratorio que indican activación de procoagulantes, activación fibrinolítica, consumo de inhibidores de la coagulación y evidencias bioquímicas de daño o falla multi orgánica.

A pesar de que las manifestaciones hemorrágicas, en ocasiones son más evidentes, la trombosis microvascular y a veces de grandes vasos, es una de las responsables de perpetuar el daño orgánico múltiple que acompaña a esta condición, agravando la situación y pudiendo conducir hacia la muerte del paciente. En los últimos años ha aumentado en gran medida el conocimiento sobre la fisiopatología de la CID, lo que conduce a una mejor comprensión del trastorno hemostático y proporciona puntos de impacto para mejores estrategias de tratamiento complementario. Además, se han desarrollado y validado algoritmos sencillos para establecer un diagnóstico de CID en la práctica clínica.

2.2. Condiciones clínicas asociadas al desarrollo de CID

La CID se ha asociado a múltiples entidades clínicas bien definidas, las que se mencionan a continuación:

a) **Sepsis.** La CID puede complicar hasta el 30% de los pacientes con sepsis graves, tanto de etiología bacteriana, como viral, fúngica o parasitaria.

Es conocida la relación entre coagulación e inflamación, caracterizada por la activación de la coagulación inducida por citoquinas (inmunotrombosis), con posterior afectación de los sistemas anticoagulantes, fibrinolítico y función endotelial.

Particularmente, en la sepsis bacteriana el mecanismo involucrado es la activación directa de la coagulación por componentes de membrana específicos del microorganismo, endotoxinas o mucopolisacáridos, con activación de plaquetas, monocitos/macrófagos y polimorfonucleares, que exponen factor tisular determinando la generación de trombina. A su vez, las endotoxinas liberadas por estos microorganismos, activan el Factor XII y Factor XI, lo cual junto a la activación plaquetaria y de monocitos, producen más activación de la coagulación. Las endotoxinas también pueden producir la liberación de citoquinas como factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), interleukina 1 (IL-1) y activar el sistema del complemento, produciendo destrucción endotelial y perpetuando el daño multiorgánico. La relación entre “complemento y coagulación” es bien conocida, pero a este escenario, se añade el efecto procoagulante de la NETosis Durante la NETosis, los neutrófilos liberan cromatina neutrofílica junto con proteínas antibacterianas que se originan de la degranulación generando “trampas

extracelulares de neutrófilos" (NET), que pueden capturar y eliminar bacterias y otros patógenos para evitar su propagación. Las proteínas del complemento activadas pueden estimular la formación de NET, y las NET, a su vez, pueden servir como plataforma para la activación del complemento. Además, los NET tienen un efecto procoagulante, sirviendo como base para la formación de trombos, desencadenando la coagulación de una manera dependiente de las plaquetas, pero también pueden estimular directamente la cascada de la coagulación con la consiguiente activación de trombina. Los neutrófilos y las plaquetas interactúan y se adhieren entre sí a través de la glicoproteína Ibα, la unión de las plaquetas a los NET puede conducir a la agregación plaquetaria en el proceso hacia la formación de coágulos.

Esta relación entre inflamación/inmunidad/coagulación, no es exclusiva de la sepsis, se produce en otros procesos con daño tisular, ateroesclerosis, defensa de huésped contra diversos patógenos, entre otros escenarios.

b) **Trauma severo.** El politrauma o traumatismo severo es otra condición clínica que se asocia a CID, conformando una entidad compleja conocida como "coagulopatía asociada a trauma" e involucra diversos mecanismos que incluyen un trastorno de la coagulación por dilución, hemorragia, infusión de tratamiento de reemplazo y disfunción de la pared del vaso asociada al trauma. Por otra parte el rol de la inflamación es clave dado que está demostrado que los niveles sistémicos de mediadores inflamatorios en traumatismos graves son similares a los de sepsis grave. Además, la liberación de restos de tejido y la perturbación de las células endoteliales puede exacerbar la activación hemostática sistémica presente en esta condición clínica.

c) **Embarazo.** Afortunadamente el desarrollo de una CID durante el embarazo es una condición poco frecuente, se reportan tasas de 0.03 a 0.35% según los países.

Distintas complicaciones durante el embarazo pueden condicionar el desarrollo de una CID, entre ellas se destacan el síndrome HELLP (hemólisis, aumento enzimas hepáticas y trombocitopenia por sus siglas en inglés), preeclampsia, desprendimiento de placenta, hipertensión inducida por el embarazo, feto muerto retenido, embolia de líquido amniótico, placentación anormal (placenta acreta, placenta previa), hígado graso agudo del embarazo y septicemia. Todos ellos son cuadros agudos y graves que comprometen la vida de la madre y el feto.

El desarrollo de una CID en estos escenarios responde a múltiples mecanismos como la disfunción endotelial, activación de plaquetas, activación trofoblástica de la cascada de coagulación, hemorragia y deterioro de la función hepática.

d) **Neoplasias.** En las neoplasias es bien conocida la activación de la coagulación, pudiendo presentarse como una CID en su forma más extrema.

El curso clínico de la CID en pacientes con neoplasias es típicamente menos intensa en comparación con la CID producida en otros escenarios clínicos. Las

alteraciones hemostáticas se producen de forma más lenta, menos generalizada y con resultados menos fulminantes, pudiendo permanecer asintomático.

Sin embargo, en algunas situaciones, el continuo consumo puede resultar en niveles bajos de plaquetas y factores de coagulación, condicionando sangrados, frecuentemente localizados en el sitio del tumor o en metástasis distantes.

Alternativamente, en ocasiones, el cuadro puede estar caracterizado por complicaciones trombóticas, que van desde trombosis vascular clínicamente manifiesta hasta trombos plaquetarios microvasculares.

Se observa más frecuentemente en pacientes con neoplasias avanzadas, y cuando existe presencia de necrosis en el tumor. Las células tumorales expresan factor tisular en su superficie, que tras su unión al FVIIa desencadenarían la activación del FIX y FX, con la consiguiente producción de trombina. Otra vía por la cual las neoplasias pueden producir CID es mediante la expresión de proteínas fibrinolíticas como activadores del plasminógeno incluyendo el activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (u-PA) y activador de plasminógeno de tipo tisular (t-PA), contribuyendo a un estado de hiperfibrinólisis, mientras que otros tumores pueden expresar el inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1(PAI-1), que daría lugar a actividad antifibrinolítica. A estos mecanismos se agrega la lesión y la disfunción de las células endoteliales que pueden contribuir aún más a la coagulopatía.

e) **Neoplasias hematológicas.** Las neoplasias hematológicas también pueden asociarse a CID, tanto las leucemias agudas como los Linfomas no Hodgkin. La entidad que con mayor frecuencia puede desencadenar una CID es la Leucemia Promielocítica Aguda (LPA, antigua M3 de la clasificación FAB); casi el 70% de los pacientes con LPA recién diagnosticados desarrollan CID. En cuanto a las otras neoplasias hematológicas, aproximadamente el 17% y el 11% de los pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA) no LPA y con Linfoma no Hodgkin respectivamente, desarrollan CID en el momento del diagnóstico.

El desarrollo de esta coagulopatía es el resultado del daño endotelial, la activación de la coagulación (efecto procoagulante) y activación concomitante de la fibrinólisis (hiperfibrinólisis), agravando el pronóstico de estos pacientes.

A su vez, el tratamiento utilizado para estas patologías puede también desencadenar coagulopatía y CID. En el trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH), así como la terapia de Células T con receptor de antígeno quimérico (CAR T) recientemente introducida, la coagulopatía ocurre con frecuencia después de estas terapias, lo que limita el éxito del tratamiento. Es así que algunas series reportan desarrollo de CID en aproximadamente el 50% de los pacientes después de la terapia con células CAR-T junto con el síndrome de liberación de citocinas. En el TPH se produce una endotelitis, que puede desencadenar coagulopatía y complicaciones potencialmente letales.

f) **Hemólisis intravascular.** En este grupo se incluyen las reacciones hemolíticas transfusionales, transfusión masiva, anemias hemolíticas intravasculares graves (Ej. mordedura de araña), anemia hemolítica microangiopática (AHM), dentro de estas debe incluirse el Púrpura trombocitopénico trombótico (PTT), Síndrome hemolítico urémico (SHU). La faceta común de la AHM es el daño endotelial, que causa adhesión y agregación de plaquetas y la formación de trombina en pacientes con PTT y SHU. Se produce una disminución adquirida de ADAMTS-13 (A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type 1 repeats, member 13), la cual fisiológicamente cliva los multímeros ultra grandes del Factor von Willebrand (FvW). Esta disminución conduce a la acumulación de multímeros de alto peso molecular en la circulación que se unen a las plaquetas a través del complejo glucoproteico GPIb-V-IX, promoviendo su agregación y la consecuente formación de microtrombos ricos en plaquetas y FvW, provocando fenómenos trombóticos oclusivos a nivel de la micro/macrovasculatura con isquemia tisular.

h) **Quemaduras extensas.** Las quemaduras pueden desencadenar fenómenos de CID; los mecanismos son múltiples e incluyen la destrucción de tejidos con paso de enzimas o material tisular a la circulación y la microhemólisis con liberación de fosfolípidos de membrana y ADP desde los glóbulos rojos, como sucede en la hemólisis intravascular.

i) **Elementos protésicos.** Las válvulas de Le Veen o Denver para realizar "shunts" peritoneovenosos o pleurovenosos en terapias paliativas, puede desencadenar fenómenos de CID aguda. Lo mismo se ha observado con el uso de balones de contrapulsación aórtico, que pueden desencadenar fenómenos de CID crónica compensada o aguda. Estos elementos protésicos exponen la sangre a sustancias extrañas y pueden de esta forma activar la coagulación.

j) **Trastornos vasculares.** Las patologías vasculares también se asocian a CID. El síndrome de Kasabach-Merrit corresponde a la asociación de hemangiomas cavernosos y CID; alrededor de 25% de los pacientes con hemangiomas cavernosos gigantes presentan una CID crónica compensada, que puede evolucionar a un cuadro agudo por causas desencadenantes que no están bien establecidas. En pacientes que presentan telangectasia hemorrágica familiar también ocurre un fenómeno semejante, con una incidencia de CID crónica compensada de alrededor de 50%. También se ha observado en pacientes con enfermedad de pequeños vasos, como fenómenos vasoespásticos, angiopatía diabética grave y angiopatías asociadas a enfermedades autoinmunes.

k) **Enfermedad por Coronavirus-2019 (Covid-19).** Esta patología fue recientemente reconocida y debido a su rápida diseminación a nivel mundial y por su alta tasa de contagios fue declarada pandemia cuatro meses después de la descripción de los primeros casos (diciembre 2019, ciudad de Wuhan, China). Esta infección es causada por un nuevo patógeno betacoronavirus, denominado *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* (SARS-CoV-2).

Los pacientes más graves presentan coagulopatía y con frecuencia coagulación intravascular masiva similar a la CID. Si bien los mecanismos de esta coagulopatía no están completamente aclarados al momento, se plantea que la respuesta inmune desregulada liderada por explosión de citocinas inflamatorias, muerte celular, hipoxia y el daño endotelial serían los principales responsables.

La fisiopatología de la CID asociada con COVID-19 es muy diferente a la de la CID séptica, la mayoría de estos pacientes no cumplen con los criterios para las formas habituales de CID. La trombosis de COVID-19 incluye macro y microtrombosis, y el diagnóstico de esta última depende de los marcadores de coagulación y fibrinólisis. A su vez, se desarrolla una microangiopatía trombótica pulmonar local sumada a la infección con lesión directa de las células endoteliales por el virus determinando una hiperfrinolisis a nivel broncoalveolar en los pacientes con COVID-19 grave.

2.3 Fisiopatología

Las condiciones clínicas antes mencionadas provocan activación del sistema de coagulación. Esta activación de la coagulación es a menudo subclínica y puede incluso, no ser detectada por las pruebas de laboratorio de rutina. Pero en otros casos, la activación es más intensa provocando una coagulación intravascular diseminada, la cual se manifiesta clásicamente por la aparición sincronizada de una extensa formación de microcoágulos en la vasculatura, junto a una mayor tendencia al sangrado. Este proceso constante de aumento de la coagulación conduce al consiguiente depósito de fibrina, dificultando el adecuado aporte de oxígeno a la periferia, incrementando la progresión de lesión orgánica múltiple. La tendencia hemorrágica, también es secundaria a la activación de la coagulación, por agotamiento de proteínas de coagulación y plaquetas, acentuado por la disminución en la producción y mayor degradación de estos componentes y sus reguladores.

Es así que, actualmente se reconocen dos tipos de CID, uno caracterizado por una fuerte activación de la coagulación, con pobre activación de la fibrinólisis, resultando en depósitos de fibrina con trombosis vascular y secundariamente complicaciones hemorrágicas; y un segundo tipo caracterizado por excesiva fibrinólisis, con graves complicaciones hemorrágicas iniciales.

La base fisiopatológica de este proceso que conduce a la coagulopatía, independientemente de la causa que los desencadene, obedece a una combinación de vías de activación que parecen iniciarse con la exposición de factor tisular en la circulación, junto con un aumento de la interacción plaquetas-endotelio, alteración de los sistemas de regulación de los anticoagulantes naturales (antitrombina, proteína S y C e inhibidor de la vía del factor tisular) y una fibrinólisis defectuosa fundamentalmente por aumento sostenido del PAI-1, impidiendo la remoción de la fibrina formada.

Las citoquinas, quimioquinas proinflamatrorias que se producen como respuesta inflamatoria en la mayoría de las patologías citadas anteriormente, son claves mediadoras de este proceso, fundamentalmente el factor de necrosis tumoral alfa (TNFa), la interleucina 1 y 6 (IL1 e IL-6). Esta interacción bidireccional entre el sistema inmune y sistema de la coagulación se conoce como 'inmunotrombosis'.

Particularmente, durante las sepsis, esta relación entre la coagulación y fibrinólisis está regulado por una serie compleja de interacciones, ya que los patógenos microbianos inducen la síntesis y liberación de mediadores inflamatorios denominados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), sumado a la liberación, debida al daño celular, de sustancias proinflamatorias conocidos como patrones moleculares asociados a daños (DAMP). Tanto los PAMP como los DAMP activan el sistema de coagulación junto con la respuesta inmune del huésped, conduciendo al desarrollo de CID.

2.4. Características clínicas

Las manifestaciones clínicas están determinadas muchas veces por la condición desencadenante de la CID, en pacientes críticamente enfermos.

Las manifestaciones hemorrágicas, pueden ser sangrado generalizado en piel y mucosas (encía, nariz o tracto digestivo), como "púrpura" y petequias, sangrado en sitios de inserción de catéteres o en sitios de punción.

También puede manifestarse por trombosis de la microcirculación que afecta la función renal, pulmonar (síndrome de distress respiratorio del adulto) y encefálica. Las lesiones necróticas de la piel y tejido subyacente, trombo-hemorrágicas, pueden ser frecuentes y su manifestación más severa es la púrpura fulminante.

2.5. Laboratorio

Los hallazgos típicos en las pruebas de rutina de laboratorio, incluyen un descenso del recuento plaquetario, alteración de las pruebas globales de coagulación, como prolongación del tiempo de protrombina (TP), el tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPA) y el tiempo de trombina (TT), así como una elevación de los productos de degradación de la fibrina (dímeros D) o del fibrinógeno (PDF).

A su vez, se evidencia una disminución de factores de la coagulación (fibrinógeno FV, FVIII, FIX y FXI) y de inhibidores fisiológicos de la coagulación (AT, PS, PC, TAFI).

Si bien estos cambios son característicos de CID, no son exclusivos y un diagnóstico alternativo debe descartarse.

La determinación de los factores de coagulación puede no ser de utilidad, ya que algunos factores de coagulación (FVIII y fibrinógeno) se comportan como reactantes de fase aguda pudiendo encontrarse aumentados (excepto en casos extremos de hiperfibrinólisis).

2.6. Criterios diagnósticos

En general la CID se encuentra en un contexto clínico bien definido, en un paciente grave, con manifestaciones hemorrágicas y/o evidencia de trombosis, en combinación con los parámetros de laboratorio, y siempre con una condición clínica primaria reconocida como desencadenante.

Es importante repetir las pruebas para monitorizar el escenario que cambia dinámicamente en función de los resultados de laboratorio y las observaciones clínicas.

Los dos algoritmos de diagnóstico de CID más utilizados son el de la ISTH (International Society of Thrombosis and Hemostasis) y el JMHW (Japanese Ministry of Health and Welfare).

En los criterios de la ISTH, para CID manifiesta, se propone que una puntuación acumulativa de 5 o más que incluya tiempo de protrombina (TP) prolongado, disminución del recuento plaquetario y fibrinógeno y elevación de marcadores relacionados con la degradación de la fibrina, son altamente sugestivos del diagnóstico (Tabla 23.1). Algunos autores reportan sensibilidad del 91% y especificidad del 97% utilizando esta puntuación y refieren que el aumento de las puntuaciones está fuertemente correlacionado con mortalidad.

A su vez, existe un score de puntuación específico para coagulopatía inducida por sepsis (SIC), validado por la ISTH (Tabla 23.2).

La mayoría de estos scores diagnósticos para CID presentan dificultades para ser implementados en mujeres embarazadas, ya que no toman en cuenta los cambios fisiológicos en las concentraciones de fibrinógeno y dímero D durante el embarazo normal. Es por esto que se han diseñado sistemas modificados para usarse durante el embarazo.

Tabla 37-1. Criterios de CID según ISTH
Aplicar el índice solo a pacientes con una condición clínica conocida como desencadenante de CID

Categoría	Parámetro	Punto
Tiempo de Protrombina	Más de 3 segundos y menos de 6 sobre el estándar	1
	6 segundos o más que el estándar	2
Fibrinógeno	1 g/L o menor	1
Productos de degradación del fibrinógeno o dímero D	Incremento moderado*	2
	Fuerte incremento**	3
Recuento plaquetas (en miles)/microL	Entre 100 y 50	1
	50 ó menos	1

(*) Incremento moderado mayor al límite superior de lo normal pero menor 5 × límite superior de lo normal.
(**) Fuerte incremento mayor 5 × límite superior de lo normal.
Una puntuación de 5 o más puede identificar CID manifiesto por el sistema propuesto en la comunicación de 2001 del ISTH SSC sobre CID.

Tabla 37-2. Score para el diagnóstico de Coagulopatía Inducida por Sepsis (SIC)

Categoría	Parámetro	0 punto	1 punto	2 puntos
Tiempo de protrombina	TP – INR	≤1,2	>1,2	>1,4
Coagulación	Conteo plaquetario (x109/L)	≥150	<150	<100
SOFA total	Items de SOFA	0	1	≥2

Se realiza diagnóstico de SIC cuando el score es mayor o igual a 4 con un score total de TP y coagulación mayor a 2. El SOFA total es la suma de los 4 items (SOFA respiratorio, SOFA cardiovascular, SOFA hepático, SOFA renal). El score de SOFA total es 2 si el score total excede los 2 puntos. INR: International Normalisation ratio; PT: prothrombin time; SOFA: Sequential Organ Failure Assessment

2.7. Tratamiento

La piedra angular del tratamiento de la CID es el tratamiento de la afección subyacente.

La transfusión de **plaquetas o plasma** (componentes) en pacientes con CID no debe basarse solamente en los resultados de laboratorio y estos deben reservarse para pacientes que presentan hemorragia.

En pacientes con CID y hemorragia o con alto riesgo de hemorragia (pacientes postoperatorios o pacientes por someterse a un procedimiento invasivo) y un recuento de plaquetas inferior a 50.000/mm^3, debe considerarse una transfusión de plaquetas.

En pacientes con CID que no sangran, no se administra transfusión profiláctica de plaquetas si no existe un riesgo elevado de hemorragia.

En pacientes sangrantes con CID y tiempo de protrombina (TP) prolongado y tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA), la administración de plasma fresco congelado (PFC) puede ser útil. No debe instituirse basándose únicamente en pruebas de laboratorio, sino que debe considerarse en aquellos con hemorragia activa y en aquellos que requieran un procedimiento invasivo. No hay evidencia de que la infusión de plasma estimule la activación continua de la coagulación. Si la transfusión de PFC no es posible en pacientes con hemorragia debido a la sobrecarga de líquidos, se puede considerar el uso de factores, como el concentrado de complejo de protrombina, reconociendo que estos solo corregirán parcialmente el defecto porque contienen solo factores seleccionados, mientras que en la CID hay una deficiencia global de factores de coagulación.

La hipofibrinogenemia grave (<1 g / l) que persiste a pesar de la sustitución de PFC puede tratarse con concentrado de fibrinógeno o crioprecipitado.

En casos de CID en los que predomina la trombosis, como tromboembolismo arterial o venoso, púrpura fulminante grave asociada con isquemia acral o infarto cutáneo vascular, se deben considerar dosis terapéuticas de heparina. En estos pacientes en los que se percibe que existe un alto riesgo de hemorragia coexistente, puede haber beneficios en el uso de heparina no fraccionada (HNF) en infusión continua debido a su corta vida media y reversibilidad, se recomienda una dosis ajustada a peso. La monitorización del TTPA en estos casos puede ser complicada y más aún la determinación de la actividad anti FXa, por lo que es importante la observación clínica para detectar signos de hemorragia.

En pacientes críticamente graves que no sangran, se recomienda tromboprofilaxis con dosis profilácticas de heparina o heparina de bajo peso molecular.

En pacientes con sepsis grave y CID, puede considerarse el uso de proteína C activada humana recombinante. La disponibilidad de este tratamiento está limitada a centros de referencia. Los pacientes con alto riesgo de hemorragia no deben recibir proteína C activada humana recombinante. Las recomendaciones actuales de los fabricantes desaconsejan el uso de este producto en pacientes con recuentos de plaquetas menores a 30x10^9/L. En caso de procedimientos invasivos, la administración de proteína C activada humana recombinante debe suspenderse poco antes de la intervención (semivida de eliminación aproximadamente 20 min) y puede reanudarse unas horas más tarde, dependiendo de la situación clínica.

En ausencia de evidencia prospectiva adicional de ensayos controlados aleatorios que confirmen un efecto beneficioso del concentrado de antitrombina en pacientes con CID y que no reciben heparina, no se puede recomendar la administración de antitrombina.

En general, los pacientes con CID no deben ser tratados con agentes antifibrinolíticos. Los pacientes con CID que se caracteriza por un estado hiperfibrinolítico primario y que presentan hemorragia grave podrían tratarse con análogos de lisina, como ácido tranexámico.

2.8 Conclusiones

La CID representa un desafío diagnóstico, clínico y terapéutico que pone de manifiesto la importancia de la compleja interacción entre el sistema hemostático y el sistema inmunológico.

3. DEFICIENCIA DE VITAMINA K

La vitamina K fue descubierta en 1929. Juega un rol central en la coagulación ya que interviene en la carboxilación de las proteínas de la coagulación como son los factores II, VII, IX y X, y las proteínas C y S que son anticoagulantes naturales.

La vitamina K produce carboxilación del ácido glutámico transformándolo en γ-carboxiglutámico, a través de una enzima carboxilasa que es vitamina K dependiente. La vitamina K se transforma en epóxido-vitamina K, la cual a través de una epóxido reductasa vuelve a transformarse en vitamina K, para continuar el ciclo. La acción de la epóxido reductasa es bloqueada por los cumarínicos produciendo una acumulación de la forma epóxica.

Al alterarse la carboxilación del ácido glutámico se altera la carboxilación de las proteínas de la coagulación a su forma activa, ya que la carboxilación permite a los factores unirse al calcio; los productos descarboxilados son conocidos como PIVKA (“protein induced in vitamin K absence”, proteínas inducidas en ausencia de vitamina K), los cuales tienen una actividad biológica muy reducida. La alteración de la carboxilación puede estar determinada por ausencia de la vitamina o por alteración de la función hepática.

Existen tres tipos de vitamina: K_1 o phylloquinona, que se encuentra en los vegetales verdes; K_2 o menaquinona producida por bacterias de la flora intestinal, es la principal forma de depósito hepático; y K_3 o menadiona vitamina K obtenida de la madre.

3.1. Causas de deficiencia de vitamina K

- Ingesta inadecuada: Dieta reducida en alimentos ricos en esta vitamina como son: hortalizas de hojas verdes (espinaca, col, brócoli, lechuga), aceites vegetales, algunas frutas (Higo, arándanos azules), carne, queso, huevos, granos

de soja. En caso de pacientes con aporte parenteral prolongado, falta de suplementación. Esta causa es poco frecuente en adultos con dieta balanceada.

- Malabsorción: La vitamina K es liposoluble requiriendo de sales biliares para su absorción por lo que patologías que impliquen obstrucción del flujo biliar alterarán la misma, así como enfermedades inflamatorias intestinales o reducciones del área de absorción (Enfermedad de Crohn, Colitis Ulcerosa Crónica resecciones quirúrgicas, diarreas crónicas).

- Alcoholismo: Por remplazo de los nutrientes de la dieta y por interferencia con la absorción intestinal.

- Drogas: Cumarínicos (Warfarina, acenocumarol, raticidas: brodifacum, bromadiolona) Antibióticos, (cefalosporinas, isoniacida, rifampicina), salicilatos, mega dosis de vitamina E, y anticonvulsivantes (Carbamazepina, fenitoína, barbitúricos).

- Falta de profilaxis en recién nacidos de madres en tratamiento anticonvulsivante, anti tuberculoso u otros tratamientos antibióticos o que no recibieron profilaxis previa al nacimiento, con baja transferencia trans placentaria de la vitamina o bajo aporte durante la lactancia.

3.2. Diagnóstico

Se sospechará el diagnóstico ante un sangrado en el contexto de un tiempo de protrombina prolongado, eventualmente el tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPA) prolongado, con recuento plaquetario y fibrinógeno normales.

La tendencia al sangrado en respuesta al déficit de vitamina K ocurre una vez catabolizados los factores vitamina K dependientes gamma carboxilados. Esto dependerá de sus vidas medias, que van desde aproximadamente 6 horas para el factor VII a 50 horas para el factor II. Una vez por debajo de su nivel hemostático, el riesgo de sangrado aumenta. El tiempo de protrombina, que mide la clásica vía extrínseca, incluye los factores II, VII y X, por lo que se verá prolongado. El TTPA solo se verá afectado ante descensos más pronunciados, dado que, si bien incluye al factor IX, el resto estarán conservados (incluso el Factor VIII podrá estar aumentado, como reactante de fase aguda, normalizando este tiempo).

Ante estas prolongaciones, corresponde establecer el carácter deficitario de los factores mediante la prueba de mezclas con pool de plasma normal. En esta, el plasma del paciente se mezcla en partes iguales, 1:1, con pool de plasma normal y se reiteran las pruebas alteradas.

La corrección de los tiempos prolongados indica que las alteraciones se deben a déficit de factor y no a la presencia de un inhibidor de la coagulación. La eventual medición de los niveles de factores pondrá en evidencia el déficit de los factores vitamina K dependientes y la normalidad del resto.

El inicio del tratamiento con vitamina K generará una normalización progresiva de los niveles de factores, iniciándose con el factor VII. Esto explica que, tras el inicio del tratamiento, no sean esperables modificaciones de los tiempos de la coagulación hasta pasadas varias horas y se llegue a la normalización de los tiempos en el correr de los días.

3.3. Tratamiento

El tipo de tratamiento dependerá de la etiología, la gravedad del cuadro clínico y del nivel del déficit. Las opciones terapéuticas incluyen el aporte exógeno de la vitamina faltante por diferentes vías de administración según la condición del paciente, la infusión de plasma fresco congelado (PFC), y los agentes "cortocircuito" o "bypasseantes" como factor VII activado recombinante (rFVIIa), concentrado de complejo de protrombina (CCP).

En las situaciones en las que el déficit se deba al uso de antagonistas de la vitamina k, el tratamiento será guiado también por la intensidad del sangrado y el nivel del INR (Tabla 23.3 y 23.4).

En recién nacidos se realizará profilaxis con administración de la vitamina intra muscular o en dosis orales sucesivas

Tabla 37-3 Dosis recomendadas de vitamina K para el tratamiento de pacientes con una elevación asintomática del Índice Internacional Normalizado (INR) con o sin hemorragia leve.

Anticoagulante	INR	Vitamina K por vía oral	Vitamina K por vía intra venosa
Warfarina	5-9	1 a 2.5 mg para la reversión inicial 2-5 mg para neutralización rápida (dosis adicional de 1 a 2 mg si INR continúa elevado después de 24 horas	0.5 a 1 mg
	>9	2.5 a 5 mg (hasta 10 mg)	1 mg
Acenocumarol	5-8	1 a 2 mg	1 a 2 mg
	>8	3 a 5 mg	1 a 2 mg
Fenprocumona	5-9	2 a 5 mg	2 a 5 mg
	>9	2 a 5 mg	2 a 5 mg
	>10	No recomendado	Dosis individualizada para cada paciente

Tabla 37-4. Dosis recomendadas de vitamina K para el tratamiento de pacientes con hemorragia grave o potencialmente mortal

Anticoagulante	Situación	Vitamina K por vía intravenosa	Tratamiento concomitante
Warfarina	Hemorragia grave Hemorragia potencialmente mortal	5 a 10 mg 10 mg	PFC o CCP PFC, CCP o rFVIIa
Acenocumarol Fenprocumona	Hemorragia grave	5 mg	PFC, CCP y rFVIIa
	Hemorragia grave con INR <5.0	5 mg	CCP
	Hemorragia grave con INR >5.0	10 mg	CCP

4. HEMOSTASIS EN LAS ENFERMEDADES HEPÁTICAS

El hígado es el principal sitio de síntesis de proteínas procoagulantes, anticoagulantes y fibrinolíticas. Los trastornos de la hemostasia asociados a desórdenes hepáticos pueden deberse a dos mecanismos: disminución de la síntesis de proteínas de la coagulación, de la fibrinolisis e inhibitorias, y a disminución del aclaramiento de los componentes hemostáticos activados.

Las enfermedades hepáticas tales como cirrosis y hepatitis, afectan progresivamente la capacidad de síntesis del órgano. Esto ocurre tanto en el fallo hepático agudo como en procesos crónicos.

Actualmente es de amplia difusión el concepto de “hemostasis rebalanceada”, donde se encuentra un nuevo equilibrio entre los factores coagulantes, anti coagulantes y fibrinolíticos, que tiene como resultado una relativa estabilidad, que frente a nuevos retos podrá inclinarse hacia procesos hemorrágicos o trombóticos. Las alteraciones de los componentes del sistema hemostático se van a encontrar a todos los niveles como veremos a continuación.

4.1 Alteraciones hemostáticas en la enfermedad hepática

En referencia a las plaquetas, su número se ve disminuido en un amplio porcentaje de pacientes con hepatopatía. Existen diferentes causas para este descenso y dependiendo de la etiología del daño hepático predominarán unas sobre otras. En el caso del fallo hepático agudo, la trombocitopenia es leve, incluso de menor entidad que en el daño crónico y entre sus causas se encuentran el aclaramiento acelerado de las plaquetas activadas por el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS por sus siglas en inglés). En la hepatopatía crónica la trombocitopenia puede deberse al descenso en la producción de trombopoyetina, que implica un menor estímulo a nivel medular de la megacariopoyesis

y por otra parte al secuestro plaquetario a nivel esplénico por la hipertensión portal, y al retiro acelerado por parte de los macrófagos esplénicos consecuencia del hiperesplenismo.

Las propias noxas que pueden encontrarse actuando sobre el hígado (alcohol, virus, terapias anti virales) pueden también ser causantes de menor producción plaquetaria a nivel medular.

El descenso del recuento plaquetario en las hepatopatías si bien es frecuente, es de leve a moderado en su intensidad, no siendo común encontrar recuentos severamente descendidos.

Las anormalidades funcionales de las plaquetas son usualmente leves y de poca significancia clínica. El mecanismo por el cual estas alteraciones plaquetarias ocurren no está bien definido.

Es de notar que, en línea con el concepto de hemostasis re balanceada, ante descensos en número y actividad de las plaquetas, se produce tanto un aumento compensador de producción de factor de von Willebrand como un descenso de ADAMTS 13, metaloproteinasa encargada del clivaje del factor von Willebrand, equilibrando la función de adhesión plaquetaria. El factor de von Willebrand, es producido por células endoteliales, megacariocitos y plaquetas por lo que no se verá alterado por el daño hepático, sino que habrá un aumento en su producción.

En cuanto a los factores de la coagulación recordemos que todos son sintetizados por los hepatocitos con excepción del factor VIII que es sintetizado por el endotelio hepático. Resulta evidente que la disfunción hepática llevará a una baja en la producción de estos con las consecuencias a nivel de la fase de la coagulación y potencial aumento de riesgo de sangrado. Una vez más, una producción aumentada de factor VIII y factor de von Willebrand llevarán esa situación deficitaria a una nueva normalidad, con compensación de la función coagulante.

El fibrinógeno puede estar normal o aumentado al ser este reactante de fase aguda y rara vez se encuentra una disfibrinogenemia en hepatitis aguda, siendo más común en hepatitis fulminante. En la enfermedad hepática crónica en estadios avanzados, el fibrinógeno se encontrará descendido.

La producción de proteínas anticoagulantes naturales también se verá afectada con la progresión de la enfermedad hepática, con descensos en los niveles de proteína C, proteína S y antitrombina. Esta reducción acompaña a la reducción de factores, no solo evitando una tendencia al sangrado sino incluso generando una leve tendencia trombótica.

En cuanto al sistema fibrinolítico, existe descenso en la producción hepática de plasminógeno, alfa 2 antiplasmina, TAFI (Inhibidor de la fibrinolisis activable

por trombina) pero estos descensos se ven una vez más compensados por la producción de activador tisular del plasminógeno (t-PA) y PAI (inhibidor del activador del plasminógeno). En el caso de t-PA, producido a nivel de las células endoteliales, existirá una elevación tanto por aumento de su liberación por el endotelio activado como por descenso de su aclaramiento hepático. En el caso de PAI, su producción se realiza a nivel del endotelio, pero también de otros tejidos como el adiposo y mostrará niveles variables, desde normales a aumentados. La producción relativa de unos y otros generará situaciones diversas en cada paciente.

El resultado final de los déficits de factores procoagulantes, anticoagulantes y fibrinolíticos nos devuelve al concepto central de hemostasis rebalanceada. Sobre esta relativa estabilidad que se logra, el equilibrio es frágil y una situación de estrés añadida como puede ocurrir frente a procesos infecciosos, falla renal, disfunción endotelial entre otras, deja poco lugar para nuevas adaptaciones, y podrán sobrevenir eventos hemorrágicos o trombóticos. Podemos concluir que en la enfermedad hepática la alteración no se encuentra en el descenso de producción proteica general sino en el escaso margen para sobrellevar nuevos disturbios que existe.

4.2 Pruebas de laboratorio y sus limitaciones

Un conteo moderadamente bajo de plaquetas y un tiempo de protrombina prolongado, reflejado en un alto INR han sido clásicamente hallazgos comunes en pacientes con daño hepático crónico y agudo, que han generado alarma por un inminente riesgo hemorrágico. Actualmente se sabe que, si bien estos hallazgos de laboratorio son así, no implican per se un riesgo hemorrágico, sino una incapacidad de esas pruebas de reflejar en forma global la capacidad hemostática.

La evaluación de la hemostasis debe realizarse en forma más global, entendiendo que las pruebas clásicas reflejan solo fragmentos del proceso de coagulación y no la interacción entre todos los factores.

Recuento plaquetario: El recuento plaquetario tanto en daño hepático agudo como crónico se podrá encontrar descendido. Ese descenso por debajo de los valores de referencia debe ser siempre confirmado por visualización de lámina periférica para corroborar el descenso y excluir causas de pseudotrombocitopenia. No existe un punto de corte especial en estos pacientes para definir el riesgo de sangrado.

Estudios de funcionalidad plaquetaria: Estos estudios solo se encuentran disponibles en laboratorios especializados, requieren ser realizados en forma inmediata a la extracción y se precisa un recuento plaquetario en rango de referencia, no estando estandarizadas para trombocitopenia, frecuente en estos pacientes.

TP, INR y TTPA: Debido al descenso de los factores de producción hepática, se verá una prolongación de los tiempos de la coagulación en los que estos inter-

vienen. La prolongación más acusada se verá en el tiempo de protrombina, por el déficit de los factores VII, X, II y I. La metodología de medición de esta vía de la coagulación tiene en cuenta solo la concentración y actividad funcional de estos factores y no el estado general del paciente con el descenso concomitante de los anticoagulantes naturales por lo que la prolongación de este tiempo puede inducir a pensar en un estado de riesgo hemorrágico inminente.

El factor V es comúnmente utilizado en el contexto de falla hepática aguda, dado su producción a nivel hepático y su corta vida media plasmática lo que lo hacen útil como marcador de daño hepático y de regeneración.

Clásicamente se solía interpretar el INR, derivado del tiempo de protrombina, como un marcador de severidad de la alteración hemostática y del riesgo de sangrado, dirigiendo las decisiones clínicas y con frecuencia derivando en acciones terapéuticas innecesarias y potencialmente riesgosas. Actualmente la literatura internacional sostiene que el INR no es buen predictor por si solo del riesgo hemorrágico.

El INR se encuentra dentro de las determinaciones de laboratorio del índice MELD (model for end-stage liver disease). Se trata de un cálculo matemático que intenta priorizar pacientes para trasplante hepático y utiliza las determinaciones de bilirrubina, creatinina y tiempo de protrombina expresado como INR. Una de las dificultades encontradas al utilizar este score fue que en diferentes laboratorios las pruebas no eran similares y que el analito que mayormente influía en el MELD era el TP/INR debido a la falta de estandarización para pacientes con enfermedad hepática. Una alternativa sugerida fue utilizar un nuevo índice INR calibrado en base a plasma de pacientes con enfermedad hepática y sin tratamiento anti vitamina k, denominado INR liver. Este INR liver alternativo podría armonizar las diferencias y ser más adecuado para el cálculo del índice MELD pero la logística de esta incorporación a los laboratorios de rutina es compleja, reduciéndola a una opción teórica y manteniendo las dificultades propias de solo tener en cuenta esta vía dela coagulación.

El TTPA solo evalúa la función procoagulante y no refleja la severidad del daño hepático dado que la producción aumentada de factor VIII compensará el déficit de otros factores de esta vía.

Test globales de coagulación: Dado el conocimiento actual sobre los cambios hemostáticos durante la enfermedad hepática, resulta evidente la necesidad de contar con pruebas que reflejen de modo integrado los sistemas procoagulantes, anticoagulantes y fibrinolíticos.

El test de generación de trombina es una alternativa a las clásicas pruebas de coagulación. En esta prueba se mide en forma dinámica la cantidad de trombina generada durante la coagulación in vitro. La presencia de trombomodulina en la prueba, la principal activadora de la proteína C, combina la evaluación de factores pro y anticoagulantes. Pero presenta ventajas: su disponibilidad es limitada y no se encuentra completamente estandarizada.

A pesar de haberse demostrado que la cantidad de trombina producida en estos pacientes es normal incluso frente a INR prolongados, su uso como predictor de riesgo de sangrado no ha sido establecido.

Pruebas viscoelásticas como la tromboelastografía (TEG) y la tromboelastometría podrían ser más racionales y eficientes dado su capacidad para medir en forma global la coagulación, evaluando plaquetas, factores coagulantes, anti coagulantes, formación y estabilidad del coágulo. Es una prueba disponible en situaciones de urgencia, realizable al lado del paciente como prueba "point of care" con cortos tiempos de respuesta. Requiere volúmenes reducidos de muestra y es realizable en sangre entera.

Algunos estudios han demostrado que reduce las intervenciones hemo terapéuticas como transfusiones de glóbulos rojos y plasma comparado con algoritmos que solo tienen en cuenta pruebas clásicas de laboratorio. Fuera del marco de las intervenciones quirúrgicas, parece evaluar mejor el estado basal del paciente con daño hepático crónico. En ese sentido, se ha demostrado que pacientes cirróticos compensados muestran parámetros hemostáticos normales por TEG incluso cuando las pruebas clásicas de coagulación se encuentran alteradas. Como desventajas cabe establecer que su uso como predictor de riesgo de sangrado previo a intervenciones aún se encuentra en estudio, la estandarización para este contexto no se encuentra disponible, no se cuenta con valores target y requiere experiencia para la interpretación de los trazados. Otro elemento a tener en cuenta es que el dinamismo del estado hemostático de estos pacientes hace que un resultado basal de TEG no prediga la posibilidad de riesgo hemorrágico o trombótico en la evolución y serán necesarias evaluaciones seriadas.

4.3 Prevención y tratamiento

Como fue establecido, las alteraciones de laboratorio serán frecuentes y cuando no se encuentran asociadas a un trastorno clínico, no deben inducir a realizar acciones terapéuticas. En ese sentido, no es necesaria la corrección de una trombocitopenia o de un INR cuando no se vincula con un evento de sangrado, salvo por ejemplo ante el hallazgo de valores críticos en un recuento plaquetario, por debajo de 15.000 - 20.000/mm^3.

Frente a la necesidad de realizar un procedimiento invasivo, el clínico deberá individualizar el riesgo de cada paciente y el riesgo inherente al procedimiento. Para procedimientos de bajo riesgo, la opinión de expertos recomienda la no corrección rutinaria de trombocitopenias leves o tiempos de coagulación alterados mientras que cuando el procedimiento entraña un riesgo moderado o mayor, se establecerán objetivos que impliquen una óptima formación del coágulo, con valores de plaquetas por encima de 50.000-60.000/mm^3, valores que se han asociado a una correcta producción de trombina. La administración de plasma fresco para normalización de INR no ha mostrado beneficio y no es alentada. El objetivo para el fibrinógeno será superior a 120 mg/dl.

En casos de sangrado activo, como es el frecuente caso de sangrado de varices esofágicas, es importante recordar que cualquier exceso en intervenciones que impliquen transfusión de productos sanguíneos puede empeorar la situación, con aumento de las presiones portales y riesgo de volver a generar un sangrado. En sangrados de otra índole, será de capital importancia resolver las comorbilidades y agentes causantes del daño y no excederse en la reposición. En estas situaciones se recomienda la monitorización con recuento plaquetario, dosificación de fibrinógeno y realización de pruebas viscoelásticas.

Por último, es importante tener en cuenta que en estos pacientes puede haber una tendencia trombótica, incluso a pesar de presentar valores de TP/INR alterados y que esta debe ser correctamente evaluada para instaurar el tratamiento tromboprofiláctico correspondiente de acuerdo a la valoración de riesgo.

5. INHIBIDORES ADQUIRIDOS ESPECÍFICOS DE LA COAGULACIÓN

Los inhibidores adquiridos de la coagulación son anticuerpos circulantes que neutralizan en forma específica la actividad procoagulante de varios factores de coagulación produciendo sangrados. Estos inhibidores difieren del inhibidor/anticoagulante lúpico (anticuerpo antifosfolípido), ya que este es un inhibidor inespecífico que se asocia a fenómenos trombóticos.

Los inhibidores específicos pueden ser de dos tipos: (a) Aloanticuerpos, asociados a trastornos congénitos de la coagulación; y (b) Autoanticuerpos, asociados a pacientes con y sin trastornos inmunes (postparto, ancianos, enfermedades autoinmunes). Los inhibidores de factor VIII son los más frecuentes.

5.1. Inhibidores de factor VIII

5.1.1 Epidemiología

El desarrollo de autoanticuerpos que inhiben específicamente al FVIII de la coagulación, determinan un trastorno hemorrágico autoinmune, denominado Hemofilia Adquirida tipo A (HAA), esta patología presenta una tasa de mortalidad elevada, que oscila habitualmente entre el 9 y el 33%, posiblemente debida en parte a la baja sospecha clínica y retraso diagnóstico.

Su incidencia global es de aproximadamente 1.5 casos por millón de habitantes/año, pero entre los 65 y 85 años aumenta a 9 casos por millón de habitantes/año y en los mayores de 85 años esta cifra asciende a 15 por millón. A pesar de que se presenta con más frecuencia en hombres y añosos, también se ve un aumento de la incidencia en mujeres jóvenes en relación al embarazo y post-parto o con otras enfermedades autoinmunes concomitantes.

En la mitad de los casos, el desarrollo de estos anticuerpos es secundario a una condición de base, como enfermedades malignas, autoinmunes, o exposición a medicamentos. De las enfermedades inmunitarias se destaca la artritis reuma-

toide, la polimialgia reumática y el lupus eritematoso sistémico. En el 50% restante, no se encuentra una condición subyacente, sin embargo, la misma puede aparecer años posteriores al evento.

Otra población en la cual puede desarrollarse un inhibidor factor específico es en los pacientes hemofílicos congénitos, de forma secundaria al uso de factor exógeno como tratamiento o profilaxis. Se describe que entre un 20-40% de los pacientes hemofílicos pueden desarrollar un inhibidor, con mayor incidencia en los pacientes con hemofilia severa. El anticuerpo producido en este escenario es un aloanticuerpo, presentando una cinética de inhibición diferente. Existe una predisposición genética a la formación de estos inhibidores, siendo más frecuente en: afroamericanos, hermanos de pacientes con inhibidor, disminución de HLA A1 y ausencia de HLA CW5.

5.1.2. Fisiopatología

La mayoría de los inhibidores adquiridos del FVIII son anticuerpos (Ac) policlonales IgG1 e IgG4, sin embargo, en contraste a los aloanticuerpos desarrollados durante el tratamiento de la hemofilia congénita, los autoanticuerpos en la HAA pueden ser también de tipo IgA o IgM, sobre todo cuando se asocian a enfermedades hematoncológicas.

Estos Ac interfieren en la actividad procoagulante del factor, bloqueando los sitios funcionales o bien por unión a dominios que aumenta su aclaramiento.

El factor VIII es una proteína que contiene una cadena pesada y una liviana con diferentes dominios (A1-A2- B- A3- C1- C2). Dependiendo del epítope blanco contra el cual se dirige el anticuerpo, se describen distintos mecanismos de acción del inhibidor: los dirigidos al dominio A2 y A3 neutralizan la actividad procoagulante del FVIII, impidiendo su interacción con el FIXa, paso esencial en la conformación del complejo tenaza. Los dirigidos contra el dominio C2 obstaculizan la unión del FVIII a los fosfolípidos de la membrana y al FvW.

Los epítopes A2, A3 y C2, son también el blanco para los aloanticuerpos que se presentan en pacientes con hemofilia congénita, generalmente con especificidad por solo un dominio, a diferencia de los autoanticuerpos que se dirigen a varios dominios al mismo tiempo.

En cuanto a la cinética de inhibición, los aloanticuerpos de la hemofilia congénita presentan una cinética tipo I o lineal, mientras que en la HAA, el auntoanticuerpo muestra un patrón de inactivación no lineal o cinética tipo II, con una primera fase de inactivación rápida seguida de una fase de equilibrio más lenta donde puede detectarse actividad residual del FVIII, no necesariamente eficaz. Estos pacientes pueden tener concentraciones basales de factor VIII cuantificables, aun en presencia de elevados títulos de anticuerpos inhibidores. Por lo tanto, no existe correlación entre las concentraciones de factor VIII cuantificables y la severidad de las hemorragias, en contraste con lo observado en la hemofilia congénita.

5.1.3. Clínica

La HAA, como se ha descrito, es una patología infrecuente, pero de tendencia hemorrágica generalmente súbita y grave, llegando en ocasiones a ser mortal. Las manifestaciones clínicas aparecen de forma aguda, espontánea, no traumática, en pacientes sin historia personal ni familiar previa de hemorragia.

En un paciente hemofílico, se sospecha la presencia de desarrollo de inhibidores cuando el cuadro clínico se hace más severo, no responde bien a la terapia de reemplazo y requiere dosis mayores de factor para estabilizarse.

5.1.4. Laboratorio

Los pacientes con HAA, es característico que se presenten sin antecedentes previos, con una prolongación de TTPA, sin alteraciones en el resto de los parámetros básicos de coagulación (TP, TT y fibrinógeno). Este hallazgo se debe acompañar de niveles de FVIII plasmático reducidos y evidencia de un inhibidor contra el FVIII utilizando pruebas específicas.

De forma práctica, ante la presencia de TTPA prolongado, se debe realizar un estudio de mezcla en relación 1:1 (pool de plasma normal (PPN): plasma del paciente), de esta forma se puede determinar si la prolongación del TTPA se debe a déficit de factores de la coagulación o a la presencia de un inhibidor. Cuando el TTPA no corrige luego de realizar la mezcla con PPN traduce la presencia de un inhibidor.

Característicamente, la reacción entre el FVIII y su anticuerpo específico, es tiempo y temperatura dependiente, por lo que inicialmente el estudio de mezcla puede corregir cuando el TTPA de la mezcla se hace de inmediato, pero luego una incubación a 37^{o}C por 2 horas detectará el efecto del inhibidor.

Una vez detectada la presencia de un inhibidor mediante el estudio de mezclas, es posible cuantificar o titular el mismo mediante distintas pruebas especializadas, siendo el método Bethesda el más utilizado. Esta prueba se basa en la estimación de la neutralización de una concentración conocida de FVIII por su inhibidor, tras la incubación a 37°C por 2 horas. El inhibidor se cuantifica en unidades Bethesda (UB), donde una UB corresponde a la cantidad de inhibidor capaz de neutralizar al 50% del FVIII presente. Esta prueba si bien es la más ampliamente utilizada, presenta múltiples limitaciones, como la falta de especificidad, y elevados coeficientes de variación especialmente en niveles más bajos de inhibidor. Es por este motivo que se desarrollaron modificaciones del ensayo original (estabilización del pH plasmático, el empleo de plasma deficiente en FVIII como muestra de referencia), pasando a llamarse Bethesda modificado o Nijmegen. Otros métodos, menos empleados, para determinar los niveles del inhibidor, son el método Oxford y métodos de base inmunoenzimática.

La titulación del inhibidor permite clasificar a los pacientes en altos o bajos respondedores. Esta clasificación es útil para guiar el tratamiento.

5.1.5. Tratamiento

Nos referiremos al tratamiento de la HAA, ya que en otro capítulo de este libro se desarrollará la Hemofilia congénita y sus complicaciones.

Los pilares de tratamiento para la HAA son los siguientes: (a) prevenir o controlar los episodios hemorrágicos, (b) el tratamiento dirigido a erradicar el inhibidor y (c) controlar el trastorno de base si existe. Es de destacar que estos pacientes requieren un enfoque terapéutico individualizado y el mismo debe ser guiado por personal especializado.

El tratamiento hemostático dependerá de la ubicación e intensidad del sangrado, de las patologías previas del paciente, así como de la disponibilidad del mismo.

La terapia hemostática está indicada en pacientes con sangrados graves y agudos. Si bien el nivel de FVIII y/o el título del inhibidor no se correlacionan con el riesgo de sangrado, este último es útil para seleccionar la herramienta terapéutica a utilizar. Es así que en aquellos pacientes que requieran tratamiento hemostático y el nivel de inhibidor sea menor a 5 UB puede utilizarse FVIII, no habiendo evidencia sólida de qué dosis utilizar,

Para el resto de los pacientes con niveles superiores de inhibidor, el uso de FVIII es ineficaz, siendo el tratamiento de elección los agentes de cortocircuito o bypaseantes (by-pass) como FVII activado recombinante (rFVIIa) o los concentrados de complejo protrombínico activado (CCPa), ambos han demostrado ser eficaces aunque no en todos los pacientes, y no existe evidencia robusta para recomendar uno sobre otro. La duración óptima del tratamiento tampoco se encuentra claramente establecida, pero es recomendable mantenerlo hasta lograr el control de la hemorragia, pudiendo requerir dosis adicionales para prevenir el re sangrado. Una opción posible es realizar una terapia secuencial, o sea la combinación de ambos agentes bypaseantes, sobretodo en pacientes con hemorragia grave resistente al tratamiento con aFVIIr o con CCPA administrados en monoterapia a las dosis y frecuencia máximas. Se debe mantener una vigilancia estrecha del potencial trombogénico de estos agentes, individualizando la estrategia de tromboprofilaxis según los riesgos adicionales de cada paciente.

En cuanto al uso de antifibrinolíticos como el Ácido tranexámico, su uso es controvertido, en caso de utilizarse por vía sistémica, tener en cuenta que están contraindicados durante las 12 horas siguientes a la administración del CCPa.

En cuanto al anticuerpo recombinante humanizado biespecífico que mimetiza la función de FVIII, Emicizumab, si bien está aprobado para la profilaxis de hemorragias agudas en la hemofilia A congénita, en la HAA existen actualmente

algunos reportes de casos con resultados alentadores, pero la evidencia actual no es suficiente en cuanto a eficacia y seguridad como para recomendar actualmente su uso fuera de ensayos clínicos.

En cuanto al segundo pilar de tratamiento, con intención de erradicar el inhibidor, la recomendación es iniciarlo tan pronto como sea posible, al momento de la confirmación diagnóstica. Este tratamiento se basa en el uso de inmunosupresores, siendo de primera línea los corticoesteriodes (prednisona), ciclofosfamida y rituximab, solos o en combinación. El tiempo medio hasta la remisión es de 5 semanas, con una variación interindividual considerable.

El rituximab es un anticuerpo monoclonal híbrido murino/humano con especificidad frente al antígeno CD20 de la superficie de los linfocitos B, su efecto inmunosupresor responde al bloqueo en la producción de inmunoglobulinas y, por tanto, de autoanticuerpos frente al FVIII.

5.2 Otros inhibidores específicos menos frecuentes

A pesar de su baja frecuencia, es posible reconocer inhibidores de todos los factores de la coagulación que podrán aparecer en diferentes contextos. En todos los casos la sospecha clínica debe ir acompañada de una correcta evaluación e identificación por parte del laboratorio, y de la confirmación y titulación con el ensayo Bethesda para el factor deficitario.

Dentro de estos cabe destacar la presencia de inhibidores de factor V, y de factor IX, que pueden aparecer en diversos contextos como ser enfermedades autoinmunes, cáncer, cirugías, uso de algunos antibióticos, transfusiones sanguíneas y posparto.

Se podrán ver diversas presentaciones, desde aquellas asintomáticas hasta las hemorrágicas de aparición tardía, sin antecedentes personales.

De acuerdo al factor involucrado, estos inhibidores generarán la prolongación de los tiempos de coagulación. TTPA prolongado en el caso del factor IX y en el caso de factor V, TTPA y TP prolongado con TT normal.

Los tiempos alterados no corregirán en la prueba de mezcla con pool de plasma normal. Cabe recordar que si bien se recomienda una incubación de 15-30 minutos de la mezcla, no se requiere la incubación de 2 horas a 37°C, como se mencionó para la búsqueda de inhibidor de Factor VIII, dado que en estos casos los inhibidores no son tiempo y temperatura dependiente y pueden ejercer su efecto inhibitorio de inmediato. La dosificación de los factores involucrados en la vía alterada y la confirmación con el ensayo Bethesda sellarán el diagnóstico. En el caso de pacientes con patología hemato-oncológica, por ejemplo, frente a gammapatías monoclonales, es posible ver no solo un efecto inhibitorio inespecífico “in vitro” por interferencia de la paraproteína sino la aparición de inhibido-

res específicos de factor, como inhibidor de factor X, IX o incluso contra el Factor von Willebrand, siendo estos escenarios de difícil diagnóstico.

El síndrome de von Willebrand adquirido es un trastorno hemorragíparo adquirido poco común, que debe sospecharse frente a diátesis hemorrágica en pacientes sin antecedentes personales ni familiares de la enfermedad, usualmente cursando desordenes linfoproliferativos, mieloproliferativos, cardiovasculares o autoinmunes. Se trata de una alteración multifactorial donde se combinan distintos mecanismos posibles entre los que se encuentran la aparición de anticuerpos dirigidos contra el factor, la adsorción por parte de las células tumorales y el aclaramiento acelerado.

La correcta identificación de estos trastornos raros permitirá enfocar los esfuerzos terapéuticos en corregir el sangrado y la condición subyacente que lo generó.

Como se mencionó, estas alteraciones son infrecuentes y probablemente sean sub diagnosticadas debido a su baja sospecha clínica lo que suma a la dificultad en el diagnóstico, por lo que se refuerza la necesidad del trabajo multidisciplinario con fluida comunicación entre la clínica y el laboratorio.

6. LECTURAS SUGERIDAS

Marcel Levi & Suthesh Sivapalaratnam (2018): Disseminated intravascular coagulation: an update on pathogenesis and diagnosis, Expert Review of Hematology, DOI: 10.1080/17474086.2018.1500173.

de Bont CM, Boelens WC, Pruijn GJM. NETosis, complement, and coagulation: a triangular relationship. Cell Mol Immunol. 2019 Jan;16(1):19-27. doi: 10.1038/s41423-018-0024-0. Epub 2018 Mar 23. PMID: 29572545; PMCID: PMC6318284.

Haram K, Mortensen JH, Mastrolia SA, Erez O. Disseminated intravascular coagulation in the HELLP syndrome: how much do we really know? J Matern Fetal Neonatal Med. 2017 Apr;30(7):779-788. doi: 10.1080/14767058.2016.1189897. Epub 2016 Jun 8. PMID: 27181089.

Levi M. Disseminated Intravascular Coagulation in Cancer: An Update. Semin Thromb Hemost. 2019 Jun;45(4):342-347. doi: 10.1055/s-0039-1687890. Epub 2019 Apr 30. PMID: 31041800.

Ikezoe T. Advances in the diagnosis and treatment of disseminated intravascular coagulation in haematological malignancies. Int J Hematol. 2021 Jan;113(1):34-44. doi: 10.1007/s12185-020-02992-w. Epub 2020 Sep 9. PMID: 32902759.

Levi M, Iba T. COVID-19 coagulopathy: is it disseminated intravascular coagulation? Intern Emerg Med. 2021 Mar;16(2):309-312. doi: 10.1007/s11739-020-02601-y. Epub 2020 Dec 24. PMID: 33368021; PMCID: PMC7758412.

Toh CH, Hoots WK; SSC on Disseminated Intravascular Coagulation of the ISTH. The scoring system of the Scientific and Standardisation Committee on Disseminated Intravascular Coagulation of the International Society on Thrombosis and Haemostasis: a 5-year overview. J Thromb Haemost. 2007 Mar;5(3):604-6. doi: 10.1111/j.1538-7836.2007.02313.x. Epub 2006 Nov 10. PMID: 17096704.

Levi M, Toh CH, Thachil J, Watson HG. Guidelines for the diagnosis and management of disseminated intravascular coagulation. British Committee for Standards in Haematology. Br J Haematol. 2009 Apr;145(1):24-33. doi: 10.1111/j.1365-2141.2009.07600.x. Epub 2009 Feb 12. PMID: 19222477.

Huth-Kühne A, Baudo F, Collins P, Ingerslev J, Kessler CM, Lévesque H, Castellano ME, Shima M, St-Louis J. International recommendations on the diagnosis and treatment of patients with acquired hemophilia A. Haematologica. 2009 Apr;94(4):566-75. doi: 10.3324/haematol.2008.001743. PMID: 19336751; PMCID: PMC2663620.

W Collins P, Chalmers E, Hart D, Jennings I, Liesner R, Rangarajan S, Talks K, Williams M, R M Hay C; United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organization. Diagnosis and management of acquired coagulation inhibitors: a guideline from UKHCDO. Br J Haematol. 2013 Sep;162(6):758-73. doi: 10.1111/bjh.12463. Epub 2013 Jul 25. PMID: 23889317.

Collins P, Baudo F, Huth-Kühne A, Ingerslev J, Kessler CM, Castellano ME, Shima M, St-Louis J, Lévesque H. Consensus recommendations for the diagnosis and treatment of acquired hemophilia A. BMC Res Notes. 2010 Jun 7;3:161. doi: 10.1186/1756-0500-3-161. PMID: 20529258; PMCID: PMC2896368.

Tiede A, Collins P, Knoebl P, Teitel J, Kessler C, Shima M, Di Minno G, d'Oiron R, Salaj P, Jiménez-Yuste V, Huth-Kühne A, Giangrande P. International recommendations on the diagnosis and treatment of acquired hemophilia A. Haematologica. 2020 Jul;105(7):1791-1801. doi: 10.3324/haematol.2019.230771. Epub 2020 May 7. PMID: 32381574; PMCID: PMC7327664.

Knoebl P, Thaler J, Jilma P, Quehenberger P, Gleixner K, Sperr WR. Emicizumab for the treatment of acquired hemophilia A. Blood. 2021 Jan 21;137(3):410-419. doi: 10.1182/blood.2020006315. PMID: 32766881.

Ahmad, J., & Lau. (2013). Clinical applications of the Model for End-Stage Liver Disease (MELD) in hepatic medicine. Hepatic Medicine: Evidence and Research, 1. https://doi.org/10.2147/hmer.s9049.

Gatt, A., Chen, D., Pruthi, R., Kamath, P., Leise, M., Ashrani, A., Nichols, W., & He, R. (2014). From Vitamin K Antagonists to Liver International Normalized Ratio: A Historical Journey and Critical Perspective. Seminars in Thrombosis and Hemostasis, 40(08), 845–851. https://doi.org/10.1055/s-0034-1395160.

Harrison, M. (1996). The Misunderstood Coagulopathy of Liver Disease: A Review for the Acute Setting. Western Journal of Emergency Medicine, 19(5), 863–871. https://doi.org/10.5811/westjem.2018.7.37893.

Hoffman, M. (2015). Coagulation in Liver Disease. Seminars in Thrombosis and Hemostasis, 41(05), 447–454. https://doi.org/10.1055/s-0035-1550435

Intagliata, N. M., Argo, C. K., Stine, J. G., Lisman, T., Caldwell, S. H., & Violi, F. (2018). Concepts and Controversies in Haemostasis and Thrombosis Associated with Liver Disease: Proceedings of the 7th International Coagulation in Liver Disease Conference. Thrombosis and Haemostasis, 118(08), 1491–1506. https://doi.org/10.1055/s-0038-1666861.

Kujovich, J. L. (2015). Coagulopathy in liver disease: a balancing act. Hematology, 2015(1), 243–249. https://doi.org/10.1182/asheducation-2015.1.243.

Northup, P. G., & Caldwell, S. H. (2013). Coagulation in Liver Disease: A Guide for the Clinician. Clinical Gastroenterology and Hepatology, 11(9), 1064–1074. https://doi.org/10.1016/j.cgh.2013.02.026.

Rovegno, M., Vera, M., Ruiz, A., & Benítez, C. (2019). Current concepts in acute liver failure. Annals of Hepatology, 18(4), 543–552. https://doi.org/10.1016/j.aohep.2019.04.008.

Stotts, M. J., Davis, J. P., & Shah, N. L. (2020). Coagulation testing and management in liver disease patients. Current Opinion in Gastroenterology, 36(3), 169–176. https://doi.org/10.1097/mog.0000000000000635.

Stravitz, R. T. (2018). Algorithms for managing coagulation disorders in liver disease. Hepatology International, 12(5), 390–401. https://doi.org/10.1007/s12072-018-9886-6.

Tripodi, A. (2017). Hemostasis in Acute and Chronic Liver Disease. Seminars in Liver Disease, 37(01), 028–032. https://doi.org/10.1055/s-0036-1597770.

Tripodi, A., Chantarangkul, V., Primignani, M., Fabris, F., Dell'Era, A., Sei, C., & Mannuccio Mannucci, P. (2007). The international normalized ratio calibrated for cirrhosis (INRliver) normalizes prothrombin time results for model for end-stage liver disease calculation. Hepatology, 46(2), 520–527. https://doi.org/10.1002/hep.21732.

Tripodi, A., & Mannucci, P. M. (2011). The Coagulopathy of Chronic Liver Disease. New England Journal of Medicine, 365(2), 147–156. https://doi.org/10.1056/nejmra1011170.

Card, D. J., Gorska, R., & Harrington, D. J. (2019). Laboratory assessment of vitamin K status. Journal of Clinical Pathology, 73(2), 70–75. https://doi.org/10.1136/jclinpath-2019-205997.

Marchili, M. R., Santoro, E., Marchesi, A., Bianchi, S., Rotondi Aufiero, L., & Villani, A. (2018). Vitamin K deficiency: a case report and review of current guidelines. Italian Journal of Pediatrics, 44(1). https://doi.org/10.1186/s13052-018-0474-0.

Polito, N. B., Kanouse, E., Jones, C. M., McCann, M., Refaai, M. A., & Acquisto, N. M. (2019). Effect of vitamin K administration on rate of warfarin reversal. Transfusion, 59(4), 1202–1208. https://doi.org/10.1111/trf.15146.

Watson, H. G., Baglin, T., Laidlaw, S. L., Makris, M., & Preston, F. E. (2001). A comparison of the efficacy and rate of response to oral and intravenous Vitamin K in reversal of over-anticoagulation with warfarin. British Journal of Haematology, 115(1), 145–149. https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2001.03070.x.

Verbruggen B, Novakova I, Wessels H, Boezeman J, van den Berg M, Mauser-Bunschoten E. The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII:C inhibitors: improved specificity and reliability. Thromb Haemost. 1995 Feb;73(2):247-51. PMID: 7792738.

Tiede A, Collins P, Knoebl P, Teitel J, Kessler C, Shima M, Di Minno G, d'Oiron R, Salaj P, Jiménez-Yuste V, Huth-Kühne A, Giangrande P. International recommendations on the diagnosis and treatment of acquired hemophilia A. Haematologica. 2020 Jul;105(7):1791-1801. doi: 10.3324/haematol.2019.230771. Epub 2020 May 7. PMID: 32381574; PMCID: PMC7327664.

Franchini, M., Lippi, G., & Favaloro, E. (2012). Acquired Inhibitors of Coagulation Factors: Part II. Seminars in Thrombosis and Hemostasis, 38(05), 447–453. https://doi.org/10.1055/s-0032-1305779.

Díaz Concepción, Alina. (2004). Enfermedad de von Willebrand adquirida. Aspectos generales. Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia, 20(1) Recuperado en 09 de noviembre de 2021, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892004000100005&lng=es&tlng=es.

Moro, Isabel, Oliver, Carolina, Stevenazzi, Mariana, Guillermo, Cecilia, Pierri, Silvia, & Decaro, Jorge. (2010). Enfermedad de Von Willebrand adquirida en un linfoma linfoplasmocitario/Macroglobulinemia de Waldenström: reporte de caso. Revista Médica del Uruguay, 26(4), 246-252. Recuperado en 09 de noviembre de 2021, de http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-03902010000400007&lng=es&tlng=es.

Capítulo

38

TROMBOFILIAS

Jaime Pereira G.

Resumen

1. Introducción

2. Trombofilias hereditarias
2.1. Deficiencia de antitrombina
2.2. Deficiencia de proteína C
2.3. Deficiencia de proteína S
2.4. Factor V Leiden y resistencia a la proteína C activada
2.5. Mutación G20210A del gen de la protrombina
2.6. Disfibrinogenemias hereditarias
2.7. Deficiencia hereditaria de factor XII

3. Trombofilias adquiridas

3.1. Síndrome antifosfolípidos (SAF)

3.1.1. Anticuerpos antifosfolípidos

3.1.2. Antígenos

3.1.3. Patogénesis

3.1.4. Clínica

3.1.5. Diagnóstico

3.2. Cáncer

3.2.1. Moléculas procoagulantes

3.2.2. Sistema fibrinolítico

3.2.3. Citoquinas

3.2.4. Interacciones celulares

3.3. Síndromes mieloproliferativos

3.4. Hemoglobinuria paroxística nocturna

3.5. Síndrome nefrótico

4. Trombofilias por mecanismo mixto

4.1. Hiperhomocisteinemia

4.1.1. Patogenia

4.1.2. Diagnóstico

4.2. Aumento de los niveles de factores de la coagulación

5. Estrategia diagnóstica

6. Lecturas sugeridas

RESUMEN

La trombofilia se ha definido como una condición que predispone a la trombosis, como consecuencia de factores genéticos, adquiridos o ambos.

Entre los factores genéticos que predisponen a la trombosis se encuentran las deficiencias de proteínas anticoagulantes naturales tales como antitrombina, proteína C y proteína S, y el aumento de función de algunos factores de la coagulación (factor V Leiden y protrombina G20210A). Todos estos defectos presentan una mayor tendencia a la trombosis venosa la cual es de grado variable dependiendo del tipo de deficiencia.

La trombofilia adquirida comprende una serie heterogénea de defectos que, a pesar de su inequívoca asociación con un estado de hipercoagulabilidad, su patogenia es mayormente desconocida. Las trombofilias adquiridas de mayor relevancia clínica, ya sea por su gravedad o frecuencia incluyen el síndrome antifosfolípido, las enfermedades malignas, el síndrome nefrótico y enfermedades de la célula troncal hematopoyética.

Existen algunas condiciones clínicas que predisponen a la trombosis cuyo origen es por un mecanismo mixto no habiéndose aclarado el grado de contribución de factores genéticos o adquiridos. Dos ejemplos de estas condiciones lo representan la hiperhomocisteinemia y el aumento en la concentración de algunos factores de la coagulación.

La investigación de laboratorio de las trombofilias debe estar enfocada hacia a aquellos pacientes en los cuales la probabilidad de obtener un resultado positivo es mayor o los hallazgos implican un cambio en la conducta terapéutica.

1. INTRODUCCIÓN

El término trombofilia fue utilizado por primera vez por Egeberg en el año 1965 cuando describió una familia con tendencia a la trombosis, en la que se demostró un déficit de antitrombina. Posteriormente esta definición se ha ampliado, incluyendo a cualquier paciente que presente una tendencia anormal a desarrollar fenómenos trombóticos. El diagnóstico inicial de trombofilia se hace inicialmente sobre bases clínicas cuando el paciente presenta una o más de las características que se muestran en la tabla 38-1.

Entre los pacientes que se presentan clínicamente como portadores de trombofilia se puede distinguir dos categorías: (a) aquellos portadores de condiciones

protrombóticas heredables o trombofilia hereditaria, en los que esta condición es el resultado de un defecto específico a nivel de los mecanismos anticoagulantes naturales o de proteínas procoagulantes (tabla 38-2) y (b) los pacientes portadores de una serie heterogénea de condiciones clínicas que se asocian a un aumento del riesgo de desarrollar trombosis, lo que se conoce como trombofilia adquirida. En estos casos, la fisiopatología es compleja y generalmente obedece a una combinación de defectos del sistema hemostático.

Tabla 38-1. Características clínicas de las trombofilias

• Historia familiar de trombosis
• Trombosis en paciente joven
• Trombosis recurrente
• Trombosis venosa idiopática o secundaria a estímulo mínimo (por ej: embarazo)
• Trombosis arterial y venosa
• Resistencia a la heparina
• Necrosis cutánea inducida por cumarínicos
• *Púrpura fulminans* neonatal
• Trombosis venosa en sitio inusual

Tabla 38-2. Causas de trombofilia

Trombofilias hereditarias	Trombofilias adquiridas
Factor V Leiden	Síndrome antifosfolípido
Mutación G20210A del gen de protrombina	Cáncer
Deficiencia de antitrombina	Síndromes mieloproliferativos
Deficiencia de proteína C	Hemoglobinuria paroxística nocturna
Deficiencia de proteína S	Síndrome nefrótico
Disfibrinogenemia	
Deficiencia de factor XII	

2. TROMBOFILIAS HEREDITARIAS

La trombofilia hereditaria se podría definir como una tendencia al tromboembolismo venoso, determinada genéticamente. Los defectos dominantes o combinaciones de defectos leves se pueden presentar a edades tempranas, en forma recurrente y con historia familiar. Rasgos leves pueden descubrirse solo por

estudio de laboratorio. Los defectos genéticos que predisponen a la trombosis no inducen un riesgo permanente o continuo, sino que hacen más susceptible al paciente frente a las interacciones con el medio ambiente. El término trombofilia hereditaria reconoce la existencia de un defecto genético que predispone a la trombosis; sin embargo, debido a la naturaleza episódica de los eventos trombóticos, este requiere interactuar con otro factor (genético o adquirido) para precipitar la enfermedad clínica.

A continuación, se analizará las bases genéticas y la fisiopatología de los defectos más comunes y en los cuales se encuentra bien establecida su predisposición a la trombosis. Existen reportes de otras causas de trombofilia hereditaria tales como la disfibrinogenemia, alteraciones del sistema fibrinolítico, deficiencia de cofactor II de la heparina o trombomodulina, que son muy poco frecuentes o su asociación con trombosis no ha sido claramente definida.

2.1. Deficiencia de antitrombina

La deficiencia de antitrombina (AT), el primer defecto de anticoagulante natural descrito, se demostró por primera vez en una familia con historia de trombosis venosa recurrente y niveles de AT entre 40-50%.

La herencia del defecto es del tipo autosómico dominante, por lo que afecta ambos sexos en igual proporción. En la población general la frecuencia de deficiencia sintomática de AT ha sido estimada entre 1:2000 a 1:5000. Sin embargo, la deficiencia asintomática puede ser tan frecuente como 1:600. En pacientes no seleccionados con historia de tromboembolismo venoso, la frecuencia es de 1,1%; en pacientes seleccionados es alrededor de 2%. La mayoría de los pacientes son heterocigotos con niveles de AT entre 40-70%.

Desde el punto de vista fenotípico se distinguen dos tipos de deficiencia de AT. En la deficiencia clásica o tipo I, que es el resultado de una síntesis disminuida de la proteína biológicamente normal, la actividad y el antígeno de AT se encuentran proporcionalmente reducidos en el plasma. En el tipo II, que se produce por defectos moleculares discretos, la actividad funcional se encuentra muy disminuida mientras que la determinación inmunológica (cantidad de la proteína) es normal.

En la mayoría de los casos de deficiencia de AT se han demostrado defectos a nivel del gen, los que se encuentran registrados en bases de datos de actualización periódica. Deleciones mayores del gen son relativamente poco frecuentes y no se encuentra en más del 10% de los casos de deficiencia tipo I. En este tipo, se han descrito más de 100 diferentes defectos a nivel del gen, correspondiendo la mayoría (> 80%), a mutaciones puntuales, también se han encontrado inserciones o deleciones cortas, que se traducen en término prematuro de la síntesis de AT o en moléculas inestables o no secretadas. La deficiencia tipo II es habitualmente causada por mutaciones puntuales que provocan sustituciones únicas de aminoácidos que llevan a la síntesis de una proteína disfuncional. Las

características fenotípicas de la proteína pueden dar indicios sobre la región del gen que se encuentra comprometida. En este sentido, se pueden distinguir las mutaciones que afectan el sitio reactivo de la proteína de aquellas que comprometen el sitio de unión a heparina. Existen defectos genéticos con efectos pleiotrópicos, que generalmente se localizan cerca del extremo C-terminal de la proteína; esta región se ha demostrado fundamental para la estabilidad de la proteína y transmisión de cambios conformacionales. En los defectos tipo II, el riesgo de trombosis es diferente según sea el sitio comprometido de la molécula; individuos portadores heterocigotos de defectos a nivel del sitio de unión a heparina tiene un bajo riesgo de trombosis, a pesar de que en el ensayo funcional la capacidad de cofactor de la heparina de la AT está disminuida. En pacientes portadores de defectos a nivel del sitio activo, la tendencia a la trombosis es similar a la encontrada en los defectos de tipo I.

Aproximadamente 55% de los pacientes con deficiencia familiar de AT presentarán episodios de trombosis venosa a lo largo de su vida; cerca de la mitad de ellos hará su primer episodio antes de los 40 años. En alrededor del 40% de los casos la manifestación clínica inicial es espontánea, mientras que en el 60% restante está relacionada a embarazo, parto, uso de anticonceptivos orales, cirugía o trauma. Los sitios de presentación más frecuentes de la trombosis son las venas de las extremidades inferiores y mesentéricas. Cerca del 60% de los pacientes portadores de deficiencia de AT desarrolla tromboembolismo venoso recurrente y el 40% de los casos presenta signos clínicos de embolia pulmonar.

Una serie de condiciones clínicas se asocian a reducción de los niveles de AT en la sangre. La trombosis aguda y la Coagulación Intravascular Diseminada (CID) reducen significativamente los niveles de AT. Disminución de la concentración de AT se observa en la insuficiencia hepática, en el síndrome nefrótico y en usuarias de anticonceptivos orales; en el embarazo normal los valores de AT no cambian, pero sí están reducidos en la preeclampsia y eclampsia. El uso de heparina disminuye los niveles de AT en alrededor de un 20-30% del valor basal, por aumento de la excreción del inhibidor.

Debido a las numerosas condiciones que afectan los niveles de AT, el diagnóstico de la deficiencia hereditaria es difícil. Aunque un valor normal descarta razonablemente la deficiencia, niveles bajos deben ser evaluados en el contexto clínico del paciente y generalmente la determinación se debe repetir en condiciones basales, una vez que hayan regresado las situaciones clínicas asociadas a disminución de su nivel.

2.2. Deficiencia de proteína C

En 1981 Griffin y colaboradores describieron varios individuos pertenecientes a la misma familia, que presentaban niveles de proteína C (PC) de aproximadamente 50% e historia de episodios de trombosis venosa recurrentes. La proteína C activada inactiva los factores V activado y VIII activado y además posee actividad profibrinolítica y antiinflamatoria, lo que explica que su deficiencia se

asocie a un aumento en el riesgo de presentar eventos trombóticos. La deficiencia de PC se hereda en forma autosómica dominante y su expresión clínica es similar al déficit de AT.

Aproximadamente el 70% de los portadores del defecto presentarán uno o más episodios de trombosis venosa. En cerca del 70% de los pacientes, el episodio inicial se presenta en forma espontánea y el 30% restante asociado a algún factor de riesgo transitorio. En alrededor de 50% de los casos el primer episodio de trombosis ocurre antes de los 50 años. Los sitios más comunes de presentación de la trombosis son las venas de las extremidades inferiores, ileofemorales y mesentéricas. Alrededor del 60% de los casos desarrolla tromboembolismo recurrente y un 40% presenta evidencias de embolia pulmonar. Una característica clínica especial de la deficiencia hereditaria de PC es la ocurrencia de trombosis venosa superficial y trombosis de venas cerebrales.

La necrosis cutánea inducida por cumarínicos se ha asociado a la presencia de deficiencia heterocigota de PC. Este síndrome se presenta típicamente durante los primeros días de uso de la terapia anticoagulante oral, habitualmente cuando se administra una dosis de carga. Las lesiones cutáneas aparecen inicialmente como máculas eritematosas en las extremidades y tronco, que posteriormente evolucionan a lesiones necróticas. La patogenia de esta manifestación se atribuye a un estado transitorio de hipercoagulabilidad dado por la rápida caída de la PC y factor VII y mantención de los niveles de los otros factores dependientes de vitamina K para su síntesis.

El *púrpura fulminans* es una entidad clínica muy rara, que se presenta en recién nacidos con niveles de PC menores de 1%, como resultado de un defecto homocigoto o doble heterocigoto en el gen de la PC. Es un cuadro protrombótico grave que se caracteriza por aparición de trombosis y hemorragia perivascular en los capilares de la piel y presencia de lesiones eritematosas que posteriormente se vuelven necróticas.

Es importante señalar que en numerosas familias se han encontrado individuos heterocigotos con niveles bajos de PC, pero que no desarrollan trombosis. Lo mismo ocurre con los padres de recién nacidos homocigotos que debutan con un cuadro de *púrpura fulminans*, los que siendo heterocigotos obligados muy raramente presentan trombosis. Por otra parte, estudios de prevalencia en población normal han encontrado una frecuencia del defecto tan alta como 1:200 individuos sanos, de los cuales solo unos pocos desarrollan cuadros de trombosis. Estas observaciones sugieren que otros factores no bien conocidos probablemente contribuyen a modular la expresión fenotípica de la deficiencia hereditaria de PC.

La frecuencia de deficiencia de PC en pacientes no seleccionados con trombosis venosa es de 3.2% y 4.0% en pacientes seleccionados (menores de 45 años y con historia familiar). En la población general la frecuencia del defecto varía considerablemente dependiendo de los estudios entre 1:200 a 1:700 individuos sanos.

La deficiencia de PC es un desorden heterogéneo y se presenta de dos formas desde el punto de vista fenotípico. La deficiencia tipo I en que la actividad y el nivel de antígeno de la proteína muestran una disminución concordante. El tipo II se caracteriza por una disminución de la actividad con antígeno normal, lo que traduce una molécula de PC anormal.

El gen que codifica para la PC se ha localizado en el cromosoma 2q13-q14, tiene un tamaño de alrededor de 11 kb y comprende 9 exones. La base de datos actualizada del gen contiene los registros de sobre 160 mutaciones diferentes que resultan en deficiencia tipo I o II. Sorprendentemente cerca del 60% de las mutaciones que causan un defecto tipo I son "missense" y alrededor de un tercio ocurre en dinucleótidos CpG. En este caso, probablemente el cambio de aminoácido lleva a alteración en la interacción intramolecular con defectos de plegamiento y degradación intracelular acelerada. Las mutaciones "missense" en los defectos tipo II están localizados preferentemente en zonas relevantes para la función de la proteína (propéptido de escisión, interacción con trombomodulina, sitio activo, sitio de unión a sustrato).

Los niveles de PC en adultos se distribuyen en forma logarítmica y el 95% de los valores varía entre 70% y 140%. Los niveles de PC en los recién nacidos son 20-40% el valor de los adultos y los recién nacidos de pretérmino tienen valores aún menores. Deficiencia adquirida de PC se observa en insuficiencia hepática, sepsis, CID, postoperatorio, quimioterapia en cáncer de mama, uso de L-asparaginasa. Una forma muy grave de deficiencia adquirida de PC se ve en pacientes con coagulación intravascular diseminada en infecciones bacterianas o virales graves. En el embarazo normal los niveles de proteína C permanecen dentro de rangos normales. Los antagonistas de la vitamina K reducen la PC funcional y en menor grado la antigénica, por lo que el diagnóstico de deficiencia heterocigota en pacientes con tratamiento anticoagulante oral es particularmente difícil, sugiriéndose realizar las determinaciones al menos una semana después de suspendidos los cumarínicos.

2.3. Deficiencia de proteína S

En el año 1984 se describió por primera vez una familia en la que varios miembros presentaban niveles bajos de proteína S (PS) y una marcada historia de tromboembolismo venoso recurrente. La presentación clínica de los pacientes con deficiencia hereditaria de PS es similar a aquellos con deficiencia de AT o PC. Los individuos con deficiencia heterocigota de PS presentan habitualmente trombosis venosa profunda, embolia pulmonar y en alrededor de 40% de los casos, tromboflebitis superficial. También se ha descrito trombosis de venas axilares, mesentéricas y cerebrales. La edad media de aparición del primer episodio de trombosis es 28 años, con un rango entre 15 y 68 años. Un 55% de los casos se presenta en forma espontánea y en el resto está asociada a un factor precipitante identificable. La deficiencia homocigota o heterocigota compuesta es muy infrecuente y generalmente se presenta como un cuadro de *púrpura fulminans* grave en el período neonatal.

La prevalencia de la deficiencia de PS en la población general es desconocida, aunque se estima como muy baja. Un estudio mostró una prevalencia de deficiencia de PS en la población escocesa entre 0.03% y 0.13%. En trombosis venosa familiar, la prevalencia del defecto se ha encontrado entre 2% y 10% de los pacientes, dependiendo del criterio de selección.

El riesgo de trombosis asociado a la deficiencia hereditaria de PS es un problema aún no resuelto. Se ha reportado que el riesgo a lo largo de la vida de presentar trombosis venosa en portadores heterocigotos es de 5 a 11 veces comparado con familiares no portadores. Sin embargo, en estudios casos-controles, de tipo poblacional, no se encontró un riesgo aumentado de trombosis entre los portadores de la deficiencia. Se ha sugerido que el riesgo de trombosis estaría asociado al defecto genético subyacente, variando entre distintas familias portadoras de diferentes tipos de mutaciones. Por otra parte, varios otros factores, hereditarios o adquiridos, pueden aumentar el riesgo de trombosis en los individuos portadores de deficiencia de PS. Entre estos se incluye, anticonceptivos orales, embarazo, parto y puerperio, factor V Leiden y protrombina G20210A.

El diagnóstico de la deficiencia hereditaria de PS es difícil debido a limitaciones técnicas y genéticas. La existencia en el plasma de la forma libre de la PS y del complejo PS-C4BPβ+ es una dificultad para las determinaciones antigénicas y funcionales. Además, los niveles plasmáticos de PS están sujetos a variaciones por influencias biológicas, fisiológicas y patológicas. Los hombres tienen niveles más altos que las mujeres; en el embarazo y en usuarias de anticonceptivos orales los niveles de PS son significativamente menores; los recién nacidos presentan niveles bajos de PS total pero altos de PS libre.

La deficiencia de PS se ha clasificado desde el punto de vista fenotípico en tres tipos: (a) tipo I, en la cual existe una reducción concordante entre el nivel de PS total, PS libre y actividad, (b) tipo II, se refiere a un defecto funcional de la molécula, encontrándose en el laboratorio niveles normales de antígeno de PS libre y total, pero reducción de la actividad, y (c) un segundo defecto de tipo cuantitativo, tipo III, define un fenotipo en el que la PS libre está disminuida pero con niveles normales de PS total. Recientemente se ha propuesto que los tipos I y III se agrupen como un defecto cuantitativo de la PS, ya que en ambos casos existe una disminución de la PS libre plasmática.

Las mutaciones en el gen de la PS responsables de la deficiencia hereditaria se encuentran registradas en bases de datos actualizadas. El análisis genético molecular de las mutaciones en pacientes con deficiencia de PS se ve complicado por la existencia de un pseudogen con un 97% de homología con el gen verdadero. La última versión de la base de datos contiene sobre 360 mutaciones deletéreas diferentes y 30 polimorfismos del gen. Alrededor del 95% de los casos presenta un defecto cuantitativo (tipo I o III) y el 55% un defecto cualitativo (tipo II). La mayoría de las lesiones genéticas que causan deficiencia tipo I son sustituciones nucleótidos únicos, inserciones o deleciones.

La deficiencia adquirida de PS se observa en el embarazo y con el uso de anticonceptivos orales. Reducción de los niveles de PS se encuentran también durante episodios tromboembólicos agudos y en la CID. La C4BPβ es una proteína de fase aguda lo que explicaría la disminución de la actividad de la PS libre en las condiciones anteriores y en otras patologías inflamatorias, probablemente por un aumento de la forma acomplejada, inactiva de la proteína.

2.4. Factor V Leiden y resistencia a la proteína C activada

En 1993 Dahlback describió una familia en la cual varios de sus miembros presentaban resistencia a la acción anticoagulante de la proteína C activada (RPCA), fenómeno que se asociaba a un aumento en el riesgo de trombosis venosa. Posteriormente se demostró que este defecto era el resultado de una mutación puntual del Factor V de la coagulación (G1691A), que se traduce en el cambio de una arginina por una glutamina en el aminoácido 506 de la proteína C (R506Q). Este cambio se traduce en una alteración en la inactivación del factor Va por la PC activada, ya que el primer sitio de corte de la enzima es precisamente a nivel de la arginina 506. Además se ha demostrado recientemente que el FV constituye un cofactor en la acción anticoagulante de la PC activada, función que también se encuentra comprometida en el FV Leiden. Este defecto molecular provoca que el FV Leiden se inactive 10 a 20 veces más lentamente que la forma nativa, llevando a una excesiva generación de trombina, lo que se traduce en un aumento en el riesgo de trombosis venosa de 6 a 8 veces el de la población general. Es importante señalar que un 5-10% de los individuos con RPCA no son portadores de la mutación R506Q, aunque sí se ha demostrado recientemente que la RPCA por sí misma, independiente de la presencia de FV Leiden, constituye un factor de riesgo para trombosis venosa.

Numerosos estudios han demostrado que la presencia de RPCA o mutación R506Q del FV se asocia a un aumento del riesgo de trombosis. La prevalencia reportada para RPCA y/o FV Leiden en pacientes con trombosis varía ampliamente (4-64%) dependiendo de los criterios de selección y del origen étnico de las poblaciones estudiadas. Las prevalencias más altas se encuentran entre pacientes jóvenes altamente seleccionados con trombofilia no explicada. En pacientes consecutivos portadores de trombosis venosa profunda, la prevalencia de RPCA es de alrededor de un 20%. A pesar de las variaciones en la frecuencia del defecto, existe actualmente consenso que la RPCA es el factor de riesgo hereditario más común para trombosis venosa. El riesgo relativo de trombosis en los individuos afectados ha sido calculado en el rango de 30-140 veces en los homocigotos y 6 a 8 veces para los heterocigotos.

La prevalencia del FV Leiden en la población general es mayor entre Caucásicos, encontrándose los valores más altos en poblaciones del norte de Europa. Si se considera en conjunto el desequilibrio de ligamiento entre el FV Leiden y otros polimorfismos del FV, los patrones de distribución geográfica sugieren un efecto fundador, es decir, todos los individuos que portan la mutación R506Q comparten un ancestro común. La alta frecuencia de FV Leiden en algunas poblaciones

sugiere que este confería un efecto protector durante la evolución. Por ejemplo, la hipercoagulabilidad asociada a la presencia de R506Q puede haber otorgado protección contra sangrado excesivo durante el parto. La cirugía, el uso de anticonceptivos orales y la naturaleza sedentaria de la vida moderna constituyen factores circunstanciales de riesgo a los cuales no se encontraban expuestos nuestros ancestros.

La trombosis venosa profunda es la manifestación clínica más común de la RPCA; la embolia pulmonar y la tromboflebitis superficial también se observa en forma ocasional. La embolia pulmonar parece ser menos frecuente entre portadores homocigotos de R506Q que en homocigotos o portadores heterocigotos de deficiencia de PC, PS o AT. La mayoría de los estudios de casos y controles no han podido demostrar una asociación clara entre RPCA y trombosis arterial, aunque esta se ha descrito en algunos pacientes heterocigotos y homocigotos. La penetrancia de la trombosis en individuos portadores de RPCA es altamente variable, algunos jamás desarrollan trombosis mientras otros presentan episodios recurrentes a edad temprana. A la edad de 50 años alrededor del 75% de los portadores heterocigotos permanecen libres de eventos trombóticos, cifra que se reduce a un 40% entre los homocigotos. La edad media de presentación del primer episodio de trombosis en individuos heterocigotos no seleccionados es de 43 años; en familias trombofílicas, la edad media de comienzo para portadores heterocigotos seleccionados es de 23 años. Estas cifras son comparables a las encontradas para pacientes portadores de deficiencia hereditaria de PC.

El riesgo de trombosis de los individuos no depende solamente de la presencia de la mutación R506Q, sino también de la coexistencia de otros factores de riesgo genéticos o adquiridos. Esto ha quedado demostrado en numerosos estudios en que se ha encontrado una alta incidencia de trombosis en individuos portadores de la mutación R506Q en combinación con hiperhomocisteinemia, deficiencias de PC, PS o ATIII. Factores de riesgo adquiridos que se asocian a trombosis en pacientes con RPCA son el uso de anticonceptivos orales, trauma y cirugía.

2.5. Mutación G20210A del gen de la protrombina

La mutación G201210A del gen de la protrombina fue descrita en el año 1996 por Poort y colaboradores, en un estudio que consideraba al gen de la protrombina como un candidato para trombosis en familias con historia de enfermedad tromboembólica. Esta mutación consiste en una transición G→A en la región 3' no traducida del gen que codifica para la protrombina. Estudios de haplotipo sugieren que esta mutación habría nacido como un fundador único 20.000 a 30.000 años atrás. La prevalencia en la población general tiene relación con el origen étnico de esta, encontrándose en Europa en alrededor del 2% de la población (rango 0.7-4%). La prevalencia más alta se observa en la región sur de Europa (aproximadamente 3%) y la más baja en la región norte (1.7%). En Estados Unidos la prevalencia es de alrededor de 2% pero con amplia variación según la raza. Esta mutación es poco común en Africa, Asia y en nativos americanos.

Desde su primera descripción se encontró que los portadores heterocigotos del defecto presentaban niveles de protrombina (factor II) significativamente más altos (130%; rango, 95-178%) comparados con los homocigotos para la forma 20210 GG (105%; rango, 55-156%). Los individuos portadores de la forma 20210 AA tienen niveles de factor II de alrededor de 170%. Debido a que el riesgo de trombosis venosa aumenta con los niveles de protrombina, se hipotetizó que la hiperprotrombinemia sería el mecanismo fisiopatológico de la propensión a la trombosis. Esta hipótesis se ha comprobado recientemente en un estudio en el que se observó que en familias portadores del defecto el análisis de ligamiento demostró que la mutación G20210A influía simultáneamente sobre el nivel de protrombina y el riesgo de trombosis.

Desde el punto de vista molecular la mutación G→A causa una ganancia de función debido a un aumento en el reconocimiento del sitio de escisión a nivel de 3', con aumento del procesamiento del extremo 3' del gen. El resultado neto de este fenómeno es una acumulación de mRNA y aumento de la síntesis de protrombina.

Estudios *in vitro* han confirmado la hipótesis que la hiperprotrombinemia es importante en la génesis de la trombosis venosa. Butenas y colaboradores, usando un modelo in vitro de coagulación iniciada por factor tisular, demostraron que niveles de protrombina de 150%, manteniendo un nivel normal de todos los procoagulantes y anticoagulantes naturales, resultaba en un aumento significativo de la generación de trombina. Otros estudios han demostrado además que niveles altos de protrombina, pueden inhibir la inactivación del factor Va mediada por PCA.

Numerosos estudios de casos y controles han demostrado consistentemente la asociación entre protrombina G20210A y tromboembolismo venoso. En el estudio original de Poort se encontró un riesgo relativo de casi 3 veces; estudios posteriores han reportado riesgos relativos entre 2 y 12 con la mayoría de ellos entre 2 y 3. A pesar de que la mayor parte de la evidencia hasta ahora sugiere que la protrombina G20210A es un factor de riesgo real, aunque débil, para trombosis venosa, la homocigocidad no confiere un riesgo tan significativo como se observa en los defectos homocigotos de PC, PS o FV Leiden.

Aunque la mutación G20210A es un factor de riesgo de trombosis relativamente débil, se dispone de mucha evidencia que demuestra que este defecto puede interactuar con otros factores de riesgo conocido y aumentar así su potencial protrombótico. De estas asociaciones la más estudiada es aquella con el FV Leiden. Varios estudios de casos y controles muestran que el riesgo de trombosis aumenta significativamente cuando existe coherencia de los 2 defectos (riesgo relativo alrededor de 20 veces). El efecto de la mutación G20210A sobre el riesgo de trombosis en otros defectos trombofílicos (deficiencias de PC, PS, AT, hiperhomocisteinemia) no está suficientemente demostrado.

El uso de anticonceptivos orales y el embarazo constituyen situaciones en que el riesgo de trombosis aumenta considerablemente en presencia de la mutación G20210A. En usuarias de anticonceptivos orales portadoras de la mutación

el riesgo relativo de enfermedad tromboembólica aumenta cerca de 16 veces, situación similar a la reportada para el embarazo (riesgo relativo de 8 a 25 veces). Su papel en el aumento del riesgo de trombosis en la terapia de reemplazo hormonal no se ha establecido.

Hasta ahora no es claro el papel que pueda jugar la mutación G20210A en la enfermedad trombótica arterial. Aunque varios estudios no han demostrado asociación de la mutación con infarto de miocardio y accidente cerebrovascular en poblaciones mayores, varios estudios sugieren que puede ser importante en la génesis de ateroesclerosis prematura, especialmente asociada a otros factores de riesgo como cigarrillo e hipertensión.

2.6. Disfibrinogenemias hereditarias

Los defectos cualitativos del fibrinógeno se heredan habitualmente en forma autosómica dominante. Existe un gran número de mutaciones que comprometen al gen del fibrinógeno, por esta razón, la expresión fenotípica de las disfibrinogenemias hereditarias es muy heterogénea, presentándose como hallazgo en personas asintomáticas, como diátesis hemorrágica o predisposición a la trombosis. Alrededor de 20 variantes de la molécula de fibrinógeno se han demostrado asociadas a enfermedad tromboembólica.

Los defectos funcionales del fibrinógeno tales como liberación anormal de los fibrinopéptidos A y B o alteración en la polimerización de la fibrina, no son fáciles de relacionar con la tendencia protrombótica en los pacientes. En algunas disfibrinogenemias se ha encontrado unión anormal de la trombina a la fibrina; en pacientes homocigotos para este tipo de alteración, se ha observado un fenotipo clínico grave con trombosis recurrente a edad temprana. Se ha sugerido que la alteración en la unión de trombina a fibrina, resultaría en un aumento en la trombina libre en la circulación y generación de un estado protrombótico. Otras mutaciones del fibrinógeno se asocian a defectos en la polimerización de la fibrina y con una resistencia a la lisis por plasmina.

Los defectos funcionales del fibrinógeno se pueden evidenciar en el laboratorio por prolongación de los tiempos de trombina y reptilasa y determinación del nivel de fibrinógeno. Las mediciones funcionales de fibrinógeno resultan ser significativamente inferiores a las antigénicas.

2.7. Deficiencia hereditaria de factor XII

Los pacientes portadores de deficiencia de factor XII (FXII), se presentan con tiempo de tromboplastina parcial activado muy prolongado, en ausencia de manifestaciones hemorrágicas. La ausencia de manifestaciones clínicas hemorrágicas en los pacientes con deficiencias de FXII, pre-calicreína o kininógeno de alto peso molecular, son una evidencia de que estos factores no son esenciales para la hemostasia *in vivo*. Sin embargo, numerosos casos de enfermedad tromboembólica venosa y arterial se han reportado en pacientes con deficiencia de

FXII, incluyendo el primer paciente descrito con este defecto (Mr. Hageman). La tendencia a la trombosis en la deficiencia hereditaria de FXII se ha atribuido a una disminución en la capacidad fibrinolítica del plasma. La magnitud del problema no se ha dimensionado adecuadamente; algunos estudios han encontrado que alrededor de 8% de los pacientes con deficiencia de FXII presentan episodios trombóticos venosos o arteriales, incluyendo infarto de miocardio en personas jóvenes. Otras observaciones han demostrado que la heterocigocidad para deficiencia de FXII no constituiría un factor de riesgo de trombosis. La solución de esta controversia requiere de estudios más grandes en familias deficientes de FXII y seguimiento clínico prolongado.

3. TROMBOFILIAS ADQUIRIDAS

La trombofilia adquirida es un factor de riesgo específico de tromboembolismo venoso, el que comparado con aquellos que no lo presentan es bajo en relación a otros factores adquiridos de mayor frecuencia. Esto se resume en la tabla 38-3.

Tabla 38-3. Factores de riesgo para tromboembolismo venoso

Condiciones	Riesgo relativo
Cirugía mayor o trauma mayor	5-200
Historia de tromboembolismo venoso	50
Trombofilia adquirida	
Anticuerpos antifosfolípidos	
Anticuerpos anticardiolipinas elevados	2
Inhibidores no específicos (ej. anticoagulante lúpico)	10
Cáncer	5
Enfermedad médica mayor con hospitalización	5
Edad > 50 años	5
> 70 años	10
Embarazo	7
Terapia estrogénica	
Contraceptivos orales	5
Terapia reemplazo hormonal	2
Moduladores de receptores de estrógeno selectivo	
Tamoxifeno	5
Raloxifeno	3
Obesidad	1–3
Mixto (hereditario, adquirido)	
Hiperhomocisteinemia	3

Es posible que en un paciente se puedan presentar simultáneamente varios factores y que la presencia de trombosis sea la culminación de la suma de estos.

Son elementos diagnósticos de importancia de las trombofilias adquiridas, la posibilidad de su aparición en cualquiera etapa de la vida, y de ser una posible etiología en pacientes ancianos con trombosis venosa profunda espontánea sin historia de trombosis previa. Otro carácter importante es que se pueden desencadenar trombosis venosas y arteriales en diferentes localizaciones, lo cual implica en ocasiones diferente diagnóstico diferencial.

3.1. Síndrome antifosfolípido (SAF)

El Síndrome antifosfolípido (SAF) se caracteriza por la presencia de anticuerpos antifosfolípidos (aFL), trombosis arterial o venosa recurrente o abortos espontáneos, y en ocasiones trombocitopenia autoinmune.

Los anticuerpos aFL son un grupo heterogéneo de anticuerpos de clase IgG e IgM que además de encontrarse en el SAF se asocian a enfermedades del tejido conectivo, infecciones y drogas. Wasserman en 1906, utilizando un método de fijación de complemento fue el primero que pesquisó estos anticuerpos. Posteriormente durante la Segunda Guerra Mundial, se detectaron individuos positivos para serología de sífilis y que no presentaban evidencias de infección treponémica (falsos positivos); la prueba serológica utiliza una mezcla antigénica que contiene cardiolipina (CL). Diez años más tarde Conley y Hartman demostraron, a través de pruebas de coagulación, la presencia de un anticoagulante circulante que se caracteriza por prolongar las reacciones de coagulación dependientes de fosfolípidos, especialmente el Tiempo de Tromboplastina Parcial Activado (TTPA). Dos décadas después, Feinstein y Rapaport confirmaron la existencia de esta actividad anticoagulante en pacientes portadores de Lupus eritematoso sistémico (LES) y la denominaron anticoagulante lúpico (AL). En 1983, Harris y colaboradores, mediante un radioinmunoanálisis que utiliza CL en fase sólida, aumentaron significativamente la sensibilidad en la pesquisa de los anticuerpos aFL respecto a las pruebas serológicas para sífilis; desde entonces se denominó anticardiolipina (aCL) a los anticuerpos aFL detectados por este método. Posteriormente, en varios laboratorios se desarrolló un ELISA para pesquisar anticuerpos aCL, método evaluado por primera vez en un taller internacional realizado en 1986.

La asociación entre aFL y trombosis arterial y venosa fue descrita en 1983 por Hughes y en 1985 propone el nombre de síndrome anticardiolipinas, pero finalmente Harris y colaboradores en 1987 lo cambian a SAF. En el año 2010 Pengo demuestra que la triple positividad, es decir, presencia de aCL, AL y anticuerpos anti-β2Glicoproteína I (aβ2GPI) resultan en la asociación más fuerte entre aFL y eventos tromboembólicos.

Actualmente en clínica, la pesquisa de los aFL se realiza por ELISA (anticuerpos aCL y aβ2GPI) y por pruebas de coagulación (AL).

Los anticuerpos aFL son la causa más frecuente de trombofilia adquirida asociada con trombosis arterial o venosa, o ambas. Pueden localizarse en cualquier vaso arterial o venoso, como trombosis venosa profunda con embolia pulmonar secundaria, trombosis de arterias coronarias, trombosis cerebro vascular, crisis isquémicas transitorias, trombosis de vasos retinales o trombosis vascular placentaria.

En general su diagnóstico clínico se basa en la existencia de una trombosis asociada con un AL persistente, detectado por estudios de coagulación especializados y/o la presencia de títulos elevados de anticuerpos aCL IgG y/o IgM.

3.1.1. Anticuerpos antifosfolípidos

El SAF se presenta en pacientes que presentan autoanticuerpos con especificidad por proteínas que se unen a dichos fosfolípidos (ver punto 3.1.3.). Sin embargo, existen otras causas asociadas a anticuerpos aFL, como por ejemplo infecciones, que determinan la presencia de anticuerpos con especificidad por fosfolípidos aniónicos como CL; estos deben ser considerados en forma separada al SAF autoinmune. En la actualidad los anticuerpos aFL se clasifican en 4 grupos (tabla 38-4).

Tabla 38-4. Clasificación de pacientes con anticuerpos aFL

SAF autoinmune
Primario
Secundario (Asociado a LES u otras enfermedades del tejido conectivo)
Anticuerpos aFL estimulados por infección
No asociados a trombosis
Sífilis, enfermedad de Lyme, Virus Epstein Barr, Citomegalovirus
Posible asociación con trombosis
Varicela, VIH, hepatitis C
Anticuerpos aFL asociados a cáncer
Síndromes linfoproliferativos
Leucemia de células vellosas
Anticuerpos aFL inducidos por medicamentos
Fenotiazinas, quinidinas, quinina, penicilina sintética, hidralazina, alfa interferón
Anticuerpos aFL prevalentes en la población general

No se dispone de mucha información en relación a la prevalencia de anticuerpos aFL, especialmente en individuos asintomáticos. Se ha descrito entre un 1-5% en jóvenes sanos, pero su incidencia aumenta con la edad y en enfermedades crónicas coexistentes.

En pacientes con LES, la prevalencia de anticuerpos aFL fluctúa entre 12-30% para anticuerpos anticardiolipinas (aCL), y entre 15-34% para AL. En Chile existe un solo estudio, de Palomo y colaboradores, que mostró que el 60% de 90 pacientes con LES presentaba algún tipo de anticuerpos aFL y, de ellos el 44.4%, eran anticuerpos aCL, y establecen la existencia de 3,3% de anticuerpos aCL en el grupo control sano.

En individuos sanos no existe información suficiente que permita establecer qué porcentaje de los que presentan anticuerpos aFL podrían presentar en el futuro un evento trombótico, o un aborto secundario a SAF. En cambio, la posibilidad en un paciente con LES y anticuerpos aFL de desarrollar un SAF, fluctúa entre 50-70%, en un seguimiento a 20 años.

Es importante tener en consideración, especialmente para el manejo clínico, que los pacientes con anticuerpos aFL persistentes, sobre todo si presentan triple positividad, tienen un mayor riesgo de desarrollar trombosis, y por lo tanto podrían ser tributarios de un tratamiento preventivo, aun cuando este, solo es aplicable en casos de trombosis previa. Los factores de riesgo son: antecedentes de trombosis, presencia de AL, y anticuerpos aCL IgG en títulos altos y persistentes; estos factores aumentan el riesgo de trombosis en 5 veces o más.

3.1.2. Antígenos

Los anticuerpos aFL deben su nombre al hecho que hasta hace algunos años se creía que reconocían fosfolípidos aniónicos. Actualmente se sabe que en realidad tienen especificidad contra algunas proteínas con afinidad por este tipo de fosfolípidos. Varias proteínas han sido descritas como blanco de anticuerpos aFL, entre ellas: β_2GPI, protrombina, proteína C, proteína S, anexina V, kininógeno de alto y bajo peso molecular, trombomodulina, factor V y factor VII.

En 1990 tres grupos independientes, Galli y colaboradores, McNeil y colaboradores, y Matsuura y colaboradores, demostraron que los anticuerpos aFL requerían un "cofactor" plasmático, la proteína β_2GPI, para unirse a los fosfolípidos aniónicos.

La β_2GPI es también conocida como apolipoproteína H, por su asociación en el plasma con otras lipoproteínas y porque alrededor del 40% de la β_2GPI plasmática está unida a triglicéridos. Durante los últimos años, se ha avanzado en el conocimiento del papel que juega la β_2GPI en la unión de los anticuerpos aFL, específicamente: (a) Dominios de unión de la β_2GPI para la CL y los anticuerpos anti-β_2GPI, (b) frecuencia de anticuerpos anti-β_2GPI en series clínicas y (c) posibles mecanismos trombogénicos de dichos anticuerpos.

La β_2GPI es una proteína plasmática sintetizada en el hígado y que se une a moléculas con carga negativa, como fosfolípidos aniónicos, heparina y lipoproteínas, y a plaquetas activadas. Esta proteína inhibe la vía intrínseca de la coagulación *in vitro*, la actividad protrombinasa de las plaquetas y la agregación plaquetaria inducida por ADP. Sin embargo, la función de la β_2GPI *in vivo* es aún desconocida.

Desde el punto de vista estructural, la β_2GPI es una glicoproteína formada por una cadena polipeptídica de 326 aminoácidos y que posee un peso molecular aproximado de 50 kDa. Presenta cinco dominios de aproximadamente 60 residuos, cada uno con patrones altamente conservados de prolina, triptófano y cisteína, estos últimos responsables de los dos puentes disulfuro intradominio. Los dominios I-IV presentan la estructura típica de los miembros de la superfamilia de proteínas de control del complemento (CCP) también llamados, por su forma, dominios "sushi". El quinto dominio en cambio, que se encuentra hacia el extremo carboxilo, presenta 82 aminoácidos que incluyen dos cisteínas adicionales (figura 38-1).

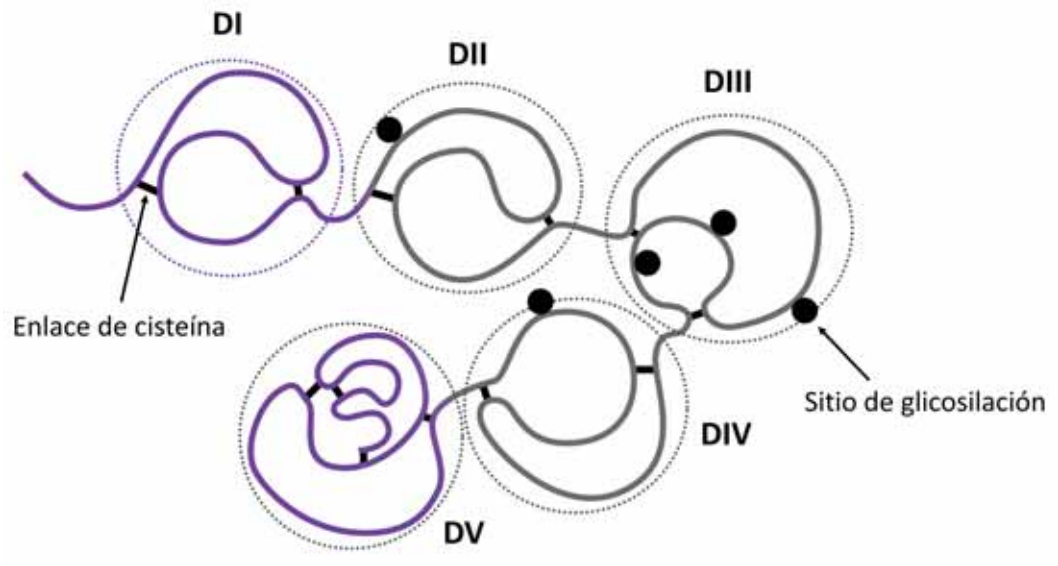


Figura 38-1. Estructura de la β_2GPI. La proteína presenta cinco dominios.

El gen que codifica para la β_2GPI humana fue clonado y secuenciado, y expresado en células eucarióticas. La secuencia aminoacídica deducida a partir del cDNA es de 345 aminoácidos que incluye 19 residuos correspondientes a un péptido señal N-terminal, no presente en la proteína madura.

Dominios de unión de la β_2GPI. Con el propósito de identificar el (los) epítopos de la β_2GPI a los que se unían la CL y los anticuerpos anti-β_2GPI, se han usado básicamente dos estrategias, uso de péptidos sintéticos y mutantes, con los que se han realizado ensayos de inhibición competitiva:

- **Unión a fosfolípidos.** Se ha demostrado que la CL se une a la secuencia aminoacídica C^{281}KNKEKKC^{288} presente en el quinto dominio de la β_2GPI. La presencia de cuatro lisinas (K), carga positivamente esta secuencia (figuras 38-1 y 38-2). Por modelamiento computacional de la estructura terciaria de la proteína, establecieron que dicha región se encuentra en la superficie de la molécula.

- **Unión de los anticuerpos anti-β2GPI.** Varias investigaciones han permitido establecer que los anticuerpos aCL presentan especificidad contra epítopos crípticos ubicados en el primer y cuarto dominios de la proteína y que se expresan como consecuencia de un cambio conformacional de la β_2GPI al unirse esta a fosfolípidos aniónicos, formando el complejo β_2GPI-FL aniónico (figura 38-2).

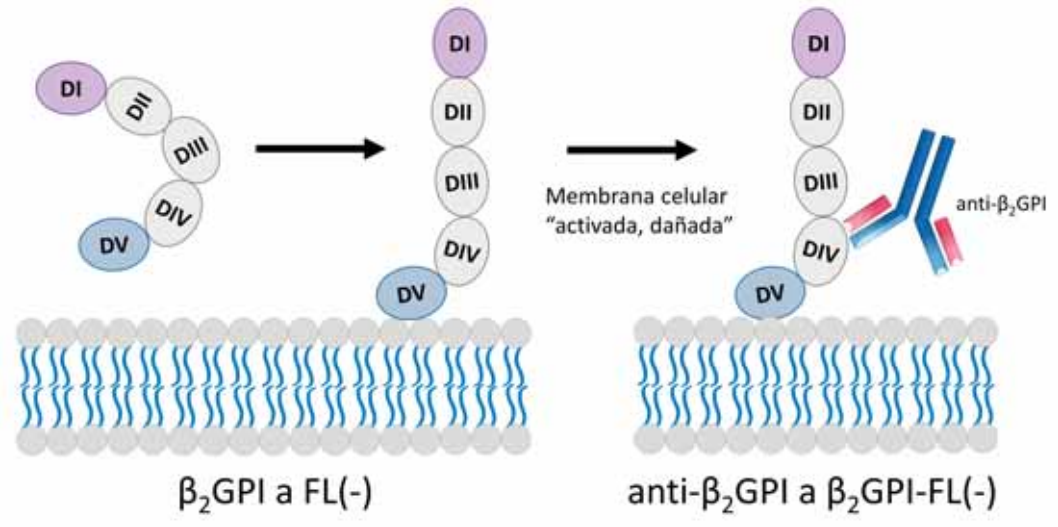


Figura 38-2. Unión de los anticuerpos anti-β_2GPI. La β_2GPI al unirse a fosfolípidos aniónicos sufre cambio conformacional que permite la unión de los anticuerpos anti-β_2GPI.

3.1.3. Patogénesis

En el SAF el principal blanco de los aFL es la β_2GPI, la dimerización de esta glicoproteína como resultado de su unión a los anticuerpos, aumenta su capacidad de unirse a superficies fosfolipídicas. Aunque la deficiencia congénita de β_2GPI no se asocia a mayor riesgo de trombosis, la unión de los anticuerpos aβ_2GPI sobre las superficies celulares resulta en un incremento en la expresión de moléculas de adhesión protrombóticas tales como E-selectina, molécula de adhesión intercelular (ICAM), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y factor tisular. Además, la unión de los anticuerpos a la β_2GPI inhibe la actividad del inhibidor de la vía extrínseca, reduce la actividad de la proteína C activada y activa el complemento. La reducción de la expresión de la anexina A2, que es el

receptor del activador tisular del plasminógeno, resulta en una menor actividad fibrinolítica.

La exposición de plaquetas a aβ_2GPI aumenta la expresión de la glicoproteína IIb/IIIa (receptor del fibrinógeno), sugiriendo que las plaquetas pueden jugar un papel clave en las interacciones protrombóticas entre aFL y las células endoteliales. Además, los monocitos y micropartículas derivadas de monocitos de pacientes con aFL presentan aumento en la expresión de factor tisular. La activación de los neutrófilos induce aumento en la expresión de factor tisular y liberación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETosis) e IL-8, fenómenos que definitivamente contribuyen a la patogénesis de la trombosis.

Recientemente, Sacharidou y colaboradores demostraron que el receptor 2 de la apolipoproteína 2 (apoER2), también conocido como LRP8, constituye un receptor mayor para los anticuerpos aβ_2GPI sobre la superficie de las células endoteliales. La uión de los aβ_2GPI a apoER2 se traduce en una reducción en la síntesis de óxido nítrico. Esta observación se suma a la demostración que en el SAF existe un aumento en la expresión de factor tisular y una disminución de la trombomodulina, resaltando la fuerte influencia de los aβ_2GPI sobre el metabolismo de las células endoteliales. En la tabla 38-5 se resume los que se ha demostrado hasta ahora en relación al efecto de los aFL sobre la hemostasia:

Tabla 38-5. Efectos proinflamatorios y protrombóticos de los anticuerpos antifosfolípidos

Activación de células endoteliales y leucocitos
• Activación del complemento
• Aumento de E-selectina
• Aumento de factor tisular
• Aumento de VEGF
• NETosis
Activación de la coagulación
• Aumento en la expresión de GPIIb/IIIa
• Disminución del inhibidor de vía extrínseca
• Disminución de la actividad de la proteína C
• Disminución de la fibrinolisis
Efectos sobre el trofoblasto
• Activación del complemento
• Disminución de la proliferación y formación de sincicio
• Disminución de gonadotrofina coriónica
• Apoptosis del trofoblasto

3.1.4. Clínica

Los pacientes portadores de anticuerpos aFL pueden encontrarse como hallazgo en la evaluación de alguna patología autoinmune, abortos precoces o como un tiempo de tromboplastina parcial activado prolongado. Los pacientes sintomáticos habitualmente consultan por complicaciones trombóticas, obstétricas u otras secuelas derivadas de los anticuerpos aFL.

Los pacientes con SAF pueden presentar tromboembolismo arterial o venoso espontáneo que puede comprometer cualquier localización u órgano. Esta trombosis se observa en un 30% de los pacientes con anticuerpos aFL. Se estima una incidencia de 2,5 eventos trombóticos por 100 pacientes/año, de ellos 2/3 son venosas y 1/3 arteriales.

La trombosis venosa es la manifestación más frecuente del SAF, especialmente de extremidades inferiores; en seguimiento de 6 años fluctúa de un 29-55% de los pacientes, de los cuales más de la mitad presentan embolia pulmonar. Las trombosis aparecen en forma espontánea, o por factores predisponentes: reposo, traumas, cirugía, anticonceptivos orales, etc.

Las trombosis arteriales son menos frecuentes y se manifiestan como isquemia o infarto. El cerebro es el órgano más comprometido (50%) en la forma de accidente vascular o crisis isquémicas transitorias. El resto de las trombosis arteriales se dividen en coronarias (23%) y el resto (27%) incluyendo estas últimas: subclavia, renal, retinal o pedias. Existen también fenómenos embólicos arteriales secundario a vegetaciones de la válvula mitral o aórtica.

Las manifestaciones clínicas del compromiso de capilares, arteriolas o vénulas, son a veces indistinguibles de un síndrome hemolítico urémico (SHU), de un púrpura trombocitopénico trombótico (PTT), u otras microangiopatías trombóticas, a veces solo diagnosticadas por biopsia.

Manifestaciones neurológicas

SAF es frecuente de encontrar en jóvenes con crisis isquémicas transitorias o accidentes vásculo-cerebrales (AVC), especialmente cuando no existen factores de riesgo de enfermedades cerebrovasculares. Los infartos del sistema nervioso central (SNC) son generalmente pequeños sin evidencia de vasculitis en la biopsia. En pacientes con LES se puede presentar embolia cerebral, y en otros casos trombosis recurrentes del SNC, llevan a una demencia por infartos múltiples. Otros síndromes neurológicos que se presentan son: migraña, síndrome de Sneddon (AVC, hipertensión arterial y lívido reticularis), síndrome de Guillain-Barré, corea, convulsiones, mielitis transversa, encefalopatía, trombosis venosa cerebral, pseudotumor cerebri, mononeuritis múltiple o amaurosis fugaz.

Manifestaciones cardíacas

El SAF se asocia a enfermedad coronaria, pudiendo condicionar infarto agudo de miocardio en personas jóvenes, y debe sospecharse cuando no existen factores de riesgo de enfermedad coronaria, o existe evidencia de oclusión coronaria trombótica o embolia sin evidencia angiográfica de enfermedad ateroesclerótica. El SAF puede ser la causa de oclusiones de "bypass" o "stent" coronarios. El compromiso valvular mitral y/o aórtico con engrosamiento, vegetaciones, regurgitaciones y estenosis se pueden demostrar con el examen de ecografía transesofágica.

Manifestaciones obstétricas

El SAF se asocia con complicaciones del embarazo como abortos, retardo del crecimiento intrauterino, síndrome de Hellp (hemólisis, elevación de transaminasas y trombocitopenia asociado a preeclampsia) oligohidroamnios, insuficiencia útero placentaria y preeclampsia.

Pacientes con anticuerpos aFL tienen una alta incidencia de abortos recurrentes desde las 10 semanas o más de embarazo, aunque en forma más aislada pueden existir abortos de las primeras nueve semanas de embarazo. En ocasiones se asocia a trombocitopenia en la madre. Estas complicaciones son frecuentes cuando los niveles de anticuerpos aCL persisten altos por más de 3 - 4 meses. El mecanismo exacto no se conoce, pero se postula que está condicionado a insuficiencia placentaria como resultado de una mala perfusión placentaria y trombosis. En este mecanismo intervendría un desplazamiento por anticuerpos aFL, de anexina V; esta es una proteína anticoagulante que se une a fosfolípidos aniónicos, y que existe en la interfase maternofetal a nivel de las vellosidades placentarias.

Manifestaciones renales

Dependerá del tipo de vaso afectado; si es de grandes vasos puede desencadenar trombosis de la vena o arteria renal, infarto renal, hipertensión, insuficiencia renal aguda o crónica, proteinuria, hematuria o síndrome nefrótico. Si el evento trombótico se presenta a nivel de capilares, arteriolas o vénulas se puede observar insuficiencia renal aguda que a menudo requiere diálisis o microangiopatía trombótica semejando SHU, PTT o hipertensión. Se ha descrito infarto de próstata y testículo secundario a SAF.

Manifestaciones pulmonares

El SAF puede determinar una trombosis espontánea de los vasos pulmonares, o manifestarse como una hipertensión pulmonar, embolia pulmonar, hemorragia alveolar o síndrome de distress respiratorio agudo.

Manifestaciones oftalmológicas

La expresión oftalmológica del SAF puede expresarse como trombosis de la vena central de la retina (TVCR) y de la arteria retinal, y amaurosis fugaz y retinitis.

Manifestaciones gastrointestinales

El tromboembolismo de grandes vasos secundario a SAF puede manifestarse de diversas maneras: Trombosis de vena mesentérica y vena porta, síndrome de Budd-Chiari, infarto hepático, intestinal o esplénico, perforación esofágica, colitis isquémica, infarto de la vesícula biliar alitiásica, pancreatitis o ascitis.

Manifestaciones hematológicas

Las manifestaciones hematológicas del SAF incluyen: trombpcitopenia, anemia hemolítica, SHU, PTT y CID en casos de SAF catastrófico. Las complicaciones hemorrágicas son muy raras ya que, en general, la trombocitopenia es moderada en un 20-40% de los pacientes; se ha observado la presencia de anticuerpos antiglicoproteínas plaquetarias (GPIIb-IIIa o GPIb-X) o sensibilización de las membranas plaquetarias activadas por anticuerpos aFL y secuestro de las plaquetas de la circulación.

Manifestaciones cutáneas

La lívido reticularis se observa en un 11-22% de los pacientes y se debe a trombosis capilar que determina una éstasis vascular cutánea caracterizada por un moteado cianótico de la piel. Esta trombosis puede manifestarse además como hemorragia, púrpura necrosante o gangrena periférica.

SAF catastrófico

El SAF catastrófico se define como un cuadro clínico que compromete al menos tres sistemas del organismo en un período de días o semanas con evidencias histopatológicas de oclusiones múltiples de vasos grandes o pequeños. En 2/3 son mujeres jóvenes cercanas a los 40 años y se caracteriza por una "tormenta trombótica" con tromboembolismo venoso masivo, con insuficiencia respiratoria, AVC, alteración de enzimas hepáticas, daño renal, insuficiencia suprarrenal y áreas de infarto en piel. La mayor parte de los casos son SAF primario y una minoría tienen LES u otras enfermedades autoinmunes como síndrome de Sjogren, esclerodermia o artritis reumatoide. La trombosis es una microangiopatía aguda de pequeños vasos que desencadena una falla orgánica múltiple. El órgano comprometido con mayor frecuencia es el riñón (78%), seguido de los pulmones (66%), SNC (56%), corazón (50%) y piel (50%).

El compromiso renal puede requerir diálisis en el 25% de los casos y se asocia a hipertensión a menudo maligna. Pueden desarrollar insuficiencia suprarrenal y CID (25% de los pacientes).

Es un síndrome con una mortalidad de un 50% por falla multiorgánica, y no existe un tratamiento establecido. Se ha obtenido buena respuesta en un pequeño grupo de pacientes con una combinación de anticoagulantes y esteroides, más plasmaféresis o IgG intravenosa (IgG IV).

3.1.5. Diagnóstico

Actualmente el diagnóstico de SAF se basa en el consenso revisado de Sapporo, (2006), el que estableció que para hacer el diagnóstico de SAF se debe tener un criterio clínico y al menos uno de los 3 de laboratorio.

a) Criterios Clínicos

Los criterios clínicos incluyen trombosis vascular y morbilidad del embarazo:

Trombosis vascular. Consiste en uno o más episodios clínicos de trombosis arterial, venosa o de pequeños vasos en cualquier tejido u órgano. La trombosis debe estar confirmada por imagenología o Doppler o histopatología, con excepción de trombosis venosa superficial. La histopatología no debe demostrar evidencia significativa de inflamación del vaso sanguíneo.

Morbilidad del embarazo. Se divide en 3 categorías:
- Categoría A: consiste en uno o más muertes no explicables de fetos morfológicamente normales, a las 10 o más semanas de gestación.
- Categoría B. consiste en una o más pérdidas prematuras de neonatos morfológicamente normales a las 34 semanas de gestación o antes, debido a preeclampsia severa o eclampsia o insuficiencia placentaria severa.
- Categoría C. consiste en tres o más abortos espontáneos consecutivos sin explicación antes de las 10 semanas de gestación seguidos de alteraciones hormonales o anatómicas de la madre o alteraciones cromosómicas de ambos padres.

b) Criterios de Laboratorio
- Anticuerpo Anticardiolipina de tipo IgG y/o IgM isotipo en suero o plasma, presente en título medio o alto (es decir, > 40 unidades de fosfolípido IgG (GPL) o unidades de fosfolípido IgM (MPL), o > del percentilo 99, o > media + 3DS de 40 controles sanos), en 2 o más ocasiones, a con un intervalo de al menos 12 semanas, medido por ensayo de ELISA.
- Anticoagulante lúpico presente en plasma, en 2 o más ocasiones al menos con 12 semanas de diferencia, detectado de acuerdo con las pautas de la International Society on Thrombosis and Hemostasis (Scientific Subcommittee on Lupus Anticoagulants/Phospholipid-Dependent Antibodies) .
- Anticuerpo anti-β2 glicoproteína-I de IgG y/o isotipo IgM en suero o plasma, presente en 2 o más ocasiones, con al menos 12 semanas de separación, medido por un ELISA, según los procedimientos recomendados.

3.2. Cáncer

La trombosis es una manifestación muy común en los pacientes con enfermedades malignas, asociación descrita por primera vez en al año 1865 por Armand Trousseau. Esta complicación ocurre en forma espontánea, después de cirugía o en pacientes que reciben quimioterapia. La enfermedad tromboembólica puede ser también la primera manifestación de una neoplasia oculta subyacente. La frecuencia de trombosis es diferente según el tipo de cáncer, observándose en algunos de ellos (ej: pulmón, páncreas), una frecuencia mayor de complicaciones trombóticas. Por otra parte, se ha sugerido que la trombosis se puede asociar a un peor pronóstico y peor supervivencia cuando se compara con pacientes portadores del mismo tipo de tumor que no han presentado eventos trombóticos.

La patogenia de la trombosis en el cáncer comprende una compleja relación entre las células tumorales, el paciente y el sistema hemostático, incluyendo activación del sistema de la coagulación y fibrinolítico, alteración del endotelio vascular y estimulación de mecanismos procoagulantes sobre la superficie de monocitos y plaquetas circulantes. Los diferentes mediadores en la interacción entre sistema hemostático y las células tumorales se muestran en la tabla 38-6.

Tabla 38-6. Mecanismos de trombosis en pacientes con cáncer

Relacionadas al tumor	Factores predisponentes
Aumento de actividad de factor tisular	Cirugía
Proteína procoagulante del cáncer (Pca)	Catéteres centrales
Citoquinas	Infecciones
Activación de la coagulación	Inmovilización
Activación de la fibrinolisis	Quimioterapia
Disminución actividad anticoagulante	Terapia hormonal
Generación de micropartículas	
Formación de Trampas extracelulares de neutrófilos (NETs)	

3.2.1. Moléculas procoagulantes

Las células tumorales a través de la expresión de moléculas procoagulantes son capaces de activar la coagulación; las más caracterizadas hasta ahora son el factor tisular (FT) y la proteína procoagulante del cáncer (PCa). El FT, que constituye el iniciador natural del mecanismo de la coagulación está sobreexpresado sobre la superficie de muchos tipos de células tumorales. El FT no se expresa sobre las células epiteliales normales pero sí lo hace como resultado de la transformación maligna. La expresión de FT no solo se correlaciona con el grado

de desdiferenciación histológica de la célula tumoral sino que también parece alterar el fenotipo de esta. Por ejemplo, aparte de su función procoagulante, el FT juega un papel importante en la capacidad de crecimiento del tumor y en la producción de metástasis.

La PCa es una cisteína-endopeptidasa de 68 kDa, presente en muchas células tumorales, que tiene la capacidad de activar directamente al factor X (FX) de la coagulación. La activación del FX se logra por escisión de la cadena pesada en un sitio diferente del que lo hacen otros activadores conocidos del factor. El antígeno de PCa es posible demostrarlo en el suero de pacientes con cáncer y ha sido incluso propuesto como un marcador tumoral sensible y específico. La PCa se ha encontrado aumentada hasta en un 85% de los pacientes con cáncer.

3.2.2. Sistema fibrinolítico

Las células tumorales expresan en su superficie todos los elementos que participan en la regulación del sistema fibrinolítico; los dos tipos de activadores del plasminógeno (t-PS y u-PA), los dos inhibidores de los activadores del plasminógeno (PAI-1 y PAI-2) y el receptor de u-PA (u-PAR). La activación del sistema fibrinolítico sobre la superficie de las células tumorales es importante en la patogenia de los defectos hemorrágicos vistos en algunos tipo de enfermedades malignas (leucemia promielocítica) y también en la capacidad de invadir y generar metástasis. Por otra parte, un defecto en la capacidad fibrinolítica, observado en algunos tipos de tumores, contribuye a la generación de un estado procoagulante.

3.2.3. Citoquinas

Las células tumorales tienen la capacidad de producir una serie de mediadores inflamatorios que pueden producir efectos procoagulantes importantes sobre el endotelio vascular. Por ejemplo, el factor de necrosis tumoral-α (TNFα) y la interleuquina-1β (IL-1β) inducen la expresión de FT sobre las células endoteliales y disminuyen la expresión de la proteína anticoagulante trombomodulina, fenómenos que transforman el endotelio normal antitrombótico en uno protrombótico. La secreción por las células tumorales del factor de crecimiento vascular y endotelial (VEGF) induce aumento de la permeabilidad vascular y juega un papel fundamental en la neovascularización del tumor.

3.2.4. Interacciones celulares

La interacción de las células tumorales con las células del huésped constituye otro mecanismo importante de alteración del sistema hemostático y generación de complicaciones tromboembólicas. Esta interacción puede ser directa entre células, mediada por moléculas de adhesión o en forma indirecta a través de la liberación de citoquinas. Un ejemplo del primer mecanismo lo constituye la activación de las plaquetas mediada por las células tumorales y la inducción de interacciones adhesivas entre las células endoteliales y las células tumorales, mediadas por la glicoproteína IIb/IIIa plaquetaria.

El estado protrombótico de los pacientes con cáncer se puede traducir en un evento trombótico como primera manifestación de esta condición o como tromboembolismo venoso en pacientes con cáncer ya diagnosticado, en cualquier etapa de su enfermedad. Estas complicaciones incluyen fenómenos tromboembólicos postoperatorios, inducidos por quimioterapia o de catéteres venosos centrales. Como ya fue sugerido por Trousseau, la trombosis venosa puede ser la primera manifestación de una enfermedad neoplásica.

Se ha demostrado que en pacientes con trombosis venosa o embolia pulmonar, en ausencia de otros factores de riesgo, la probabilidad de tener un cáncer oculto puede ser de hasta un 10%. Sin embargo, estudios de exploración tratando de demostrar un tumor en pacientes con una trombosis venosa han mostrado ser de muy bajo rendimiento, por lo que parece prematuro recomendar esta práctica en cualquier paciente que se presente con una trombosis venosa no explicada.

En pacientes portadores de enfermedades malignas demostradas, los fenómenos trombóticos se pueden presentar en cualquier momento de su evolución. La cirugía en los pacientes con cáncer representa un factor de riesgo muy importante, encontrando en algunas series seleccionadas cifras de trombosis venosa de sobre un 20%, especialmente asociadas a reposo prolongado. El riesgo de trombosis en pacientes no sometidos a cirugía reciente ha sido evaluado principalmente en cáncer de mama. En pacientes portadoras de cáncer de mama etapa II que reciben quimioterapia, la incidencia de trombosis venosa es alrededor de un 7%. La adición de tamoxifeno aumenta significativamente el riesgo de aparición de fenómenos tromboembólicos en este tipo de pacientes. Por último los pacientes usuarios de catéteres venosos centrales presentan un riesgo marcado de desarrollar trombosis axilar o subclavia. Además los catéteres por sí mismos, son trombogénicos, a pesar del uso de heparina.

3.3. Síndromes mieloproliferativos

Los sindromes mieloproliferativos crónicos (SMC) se caracterizan por la expansión clonal de una célula madre/progenitora hematopoyética anormal e incluyen policitemia vera (PV), trombocitemia esencial (ET) y mielofibrosis primaria (PMF). La trombosis venosa, a menudo en sitios inusuales, incluida la trombosis de la vena esplácnica y la trombosis arterial, así como una tendencia hemorrágica y una propensión a transformarse en mielofibrosis o leucemia aguda, son complicaciones comunes en pacientes con SMC.

La patogenia de la trombosis en pacientes con SMC es compleja y multifactorial. Los factores relacionados con la enfermedad, como un aumento en los recuentos de células sanguíneas (es decir, leucocitosis, eritrocitosis y trombocitosis) y, lo que es más importante, la presencia de la mutación JAK2 puede interactuar con factores no relacionados con la enfermedad del paciente, como la edad, antecedentes de eventos trombóticos, obesidad, hipertensión, hiperlipidemia y presencia de defectos trombofílicos. La tasa de trombosis recurrente después

de un tromboembolismo venoso (TEV) es de 6,0 a 6,5 por 100 pacientes-año en pacientes con SMC en comparación con 2,7 a 3,7 por 100 pacientes-año en pacientes sin SMC.

3.4. Hemoglobinuria paroxística nocturna

Las alteraciones de membrana características de la hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) están involucradas en las manifestaciones clínicas de la enfermedad tales como hemólisis intravascular crónica, hemoglobinuria, citopenias y trombosis. Una particularidad de la trombosis en la HPN es su predilección por los vasos intraabdominales incluyendo la circulación portal, mesentérica, hepática y renal. El segundo sitio más común de compromiso es el sistema venoso cerebral. El inicio de los episodios de trombosis es independiente de la duración de la enfermedad o del grado de hemólisis.

El mecanismo que predispone a la trombosis en la HPN es mayormente desconocido. Se ha sugerido que las alteraciones de membrana de los leucocitos los hacen susceptibles a la lisis por complemento con liberación de sustancias procoagulantes a la sangre. Las plaquetas también muestran esta misma sensibilidad al daño por complemento que se traduce en hiperagregabilidad y aumento de la actividad procoagulante.

3.5. Síndrome nefrótico

El síndrome nefrótico se caracteriza por pérdida de grandes cantidades de proteína por la orina (>3.5g/día) e hipoalbuminemia concomitante (<3.0 g/dl). La trombosis de la vena renal, que se mencionaba como causa de este cuadro, es ahora considerada una complicación con una frecuencia que puede ser tan alta como el 33% de los casos. Los fenómenos trombóticos pueden comprometer cualquier territorio vascular, lo que confirma un estado de hipercoagulabilidad.

Debido a que en el síndrome nefrótico existe pérdida de gran cantidad de proteínas, la concentración de los factores hemostáticos se puede ver afectada. Cuatro alteraciones del sistema de la coagulación se han invocado como causa de la hipercoagulabilidad en el síndrome nefrótico: (a) aumento de algunos factores de la coagulación (fibrinógeno, FV y FVII), (b) disminución de inhibidores, específicamente de ATIII, (c) defecto de fibrinolisis y (d) aumento del número y de la agregabilidad de las plaquetas.

4. TROMBOFILIA POR MECANISMO MIXTO

4.1. Hiperhomocisteinemia

La homocisteína es un aminoácido intermedio de tipo sulfidrilo que se forma durante la conversión de metionina a cisteína. La homocisteína está presente normalmente en el plasma a bajas concentraciones (5-15 umol/L). La hiperhomocisteinemia es un factor establecido independiente de riesgo vascular inclu-

yendo la trombosis, aunque existe menos evidencia de que la normalización de sus niveles, disminuya este riesgo.

El metabolismo de la homocisteína tiene dos caminos enzimáticos principales: la transulfuración para formar cistationina, o a través de la remetilación para formar metionina. La cistationina-β-sintetasa (CBS) cataliza la condensación de la homocisteína y serina para formar cistationina, utilizando piridoxal fosfato (vitamina B_6) como cofactor. La remetilación posee dos vías alternativas: (a) En una vía, 5-metiltetrahidrofolato es el dador de un grupo metil y la cobalamina (vitamina B_{12}) actúa como cofactor, y (b) en la otra vía, la betaína actúa como donante del grupo metilo y la reacción es catalizada por la betaína-homocisteína metiltransferasa. Las deficiencias hereditarias de las enzimas necesarias para la remetilación o transulfuración pueden resultar en niveles elevados de homocisteína, así como defectos adquiridos de los cofactores.

La hiperhomocisteinemia está determinada por alteraciones genéticas o nutricionales o alteraciones metabólicas como la insuficiencia renal crónica o el hipotiroidismo.

La hiperhomocisteinemia puede ser clasificada de acuerdo a los niveles de homocisteína en 3 grupos:

- Grave (concentración plasmática >100 µmol/L)
- Moderada (concentración plasmática 25 a 100 µmol/L)
- Leve (concentración plasmática 16 a 24 µmol/L)

La hiperhomocisteinemia grave es generalmente causada por la deficiencia homocigota de la enzima CBS. Esta causa retardo mental, cristalino ectópico, alteraciones esqueléticas y enfermedad trombótica arterial y venosa precoz y grave.

La hiperhomocisteinemia moderada o leve está determinada por defectos hereditarios o adquiridos del metabolismo de la homocisteína. Dentro de estos, la deficiencia heterocigota de CBS es la más común (0.3 a 1,4% de la población caucásica). Las mutaciones de la enzima metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) determinan grados variables de hiperhomocisteinemia.

Una alteración de la vía de remetilación de homocisteina a metionina está determinada por una mutante termolábil de la MTHFR, que se traduce en una reducción de su actividad. Esta variante de la enzima se produce por una transición C→T en el codón 677 que resulta en un cambio de alanina a valina en la proteína madura y que disminuye su actividad en un 50-60% en el estado homocigoto. La prevalencia de esta mutación en la población general es de alrededor de un 5% en caucásicos, 30% en europeos y japoneses y un 11% en afroamericanos. En pacientes portadores de enfermedad coronaria se ha encontrado una prevalencia de la mutación de 17%. La presencia de esta mutación no está siempre asociada a aumento en los niveles de homocisteína, lo que indica que la expresión fenotípica está probablemente influida por otros factores. Por ejemplo, pa-

cientes homocigotos para la forma termolábil de la MTHFR o heterocigotos para deficiencia de CBS, presentan hiperhomocisteinemia especialmente si coexisten con bajas concentraciones séricas de ácido fólico.

4.1.1. Patogenia

Los mecanismos por los cuales la hiperhomocisteinemia induce aterogénesis y trombogénesis no se encuentran totalmente dilucidados. Estudios *in vivo* en animales han demostrado que la homocisteína causa descamación endotelial, proliferación de células musculares lisas y engrosamiento de la íntima. Estudios *in vitro* han encontrado que el daño por homocisteína requiere cobre y oxígeno y es prevenido por catalasa pero no por superóxido dismutasa, sugiriendo que el peróxido de hidrógeno sería responsable del daño de la célula endotelial. Otros efectos de la homocisteína sobre los vasos sanguíneos y sistema hemostático incluyen: daño directo de la célula endotelial a través de la oxidación del colesterol LDL. Inhibición de la expresión de trombomodulina y la activación de PC y supresión de la expresión de heparan sulfato, y aumento de la unión a lipoproteína a fibrina. De esta manera se altera el mecanismo de los anticoagulantes naturales y se disminuye la respuesta fibrinolítica. Es importante señalar que la mayoría de los estudios sobre los efectos in vitro de la homocisteína se han demostrado usando concentraciones muy altas de esta, al menos un orden de magnitud superior a la concentración plasmática.

Estudios más recientes *in vivo* han entregado abundante evidencia de que la hiperhomocisteinemia produce alteraciones funcionales de los vasos sanguíneos; en este sentido, el aumento en el estrés oxidativo y los niveles de especies reactivas de oxígeno, jugarían un papel fundamental en estos cambios vasculares inducidos por hiperhomocisteinemia. Aparte de la alteración vascular funcional, también se ha demostrado que los niveles aumentados de homocisteína promueven el desarrollo de lesiones ateroescleróticas per se o las aumenta cuando se asocia a otros factores de riesgo.

Causas de hiperhomocisteinemia

Causas adquiridas de hiperhomocisteinemia incluyen la deficiencia de folato, vitaminas B_6 y B_{12}, cofactores esenciales en su metabolismo. Otra causa frecuente de niveles elevados de homocisteína es la insuficiencia renal crónica. Drogas que interfieren con el metabolismo del folato, tales como metotrexato y anticonvulsivantes, de la vitamina B_{12} como óxido nítrico y de vitamina B_6 como teofilina, pueden provocar alzas moderadas en los niveles de homocisteína.

Defectos genéticos que se caracterizan por niveles muy elevados de homocisteína presentan un riesgo muy alto de desarrollar precozmente complicaciones vasculares arteriales y venosas graves. Debido a que los pacientes con homocistinuria presentan lesiones ateroescleróticas graves, se postuló que la hiperhomocisteinemia moderada podría constituir un factor de riesgo para enfermedad arterial, lo que se ha comprobado en una serie de estudios epidemiológicos.

Hiperhomocisteinemia y riesgo vascular

La mayoría de los estudios de casos y controles o seccionales cruzados, han demostrado una asociación entre la hiperhomocisteinemia y daño vascular, en la forma de enfermedad coronaria, cerebrovascular o arterial periférica. Sin embargo, en estudios prospectivos en sujetos sanos al momento de enrolarlos, los resultados son controvertidos ya que de 12 estudios de este tipo solamente en 5 de ellos se encontró asociación entre hiperhomocisteinemia y riesgo cardiovascular. Estudios prospectivos en pacientes portadores de enfermedad coronaria al momento de ingresar al estudio, han mostrado una relación muy significativa entre los niveles de homocisteína y muerte cardiovascular. Estudios de meta-análisis demuestran un riesgo vascular cuando se combina enfermedad coronaria con homocigotos del alelo 677T y bajos niveles de folatos, sin embargo, este polimorfismo no siempre se asocia a hiperhomocisteinemia.

En relación a tromboembolismo venoso, existe actualmente consenso en que la mutación C677T de la MTHFR no se asocia a mayor riesgo de trombosis, por lo que no debería incluirse en el panel de estudio de laboratorio de trombofilia hereditaria.

4.1.2. Diagnóstico

La homocisteína plasmática existe libre o unida a proteínas y se mide como homocisteína plasmática total (rango 6 a 15 umol/L).

El diagnóstico se hace midiendo la homocisteína plasmática después de una noche de ayuno. En caso de que sus valores sean normales, se puede efectuar una carga de L-metionina oral 100 mg/kg con medición de sus niveles a las 4 y 6 horas, cuyo percentil 90 es de 41.3 µmol/L y 58.8 µmol/L, respectivamente.

Deben determinarse los niveles de ácido fólico sérico y de vitamina B_{12} y eventualmente demostrar la mutación C677T para MTHFR.

4.2. Aumento de los niveles de factores de la coagulación

El aumento moderado de los niveles plasmáticos de los factores de la coagulación VIII, IX y XI se han asociado a un aumento marcado del riesgo de trombosis venosa. Niveles muy altos de factor VIII y IX se asocian a riesgo de trombosis venosa recurrente. El origen adquirido o hereditario de estos niveles elevados de factores es motivo de debate, aunque se acepta que tiene un importante componente hereditario especialmente a nivel del FVIII.

El mecanismo responsable de la hipercoagulabilidad en esta situación no se ha aclarado, aunque se ha encontrado recientemente un aumento importante en la generación de trombina en el plasma de pacientes con niveles elevados de FIX y FXI.

5. ESTRATEGIA DIAGNÓSTICA

La evaluación indiscriminada de laboratorio en todo paciente que presenta un episodio de tromboembolismo venoso, no aparece justificada en el momento actual. Aparte de constituir una práctica de muy alto costo, los resultados generalmente no se traducirán en cambios de conducta y la identificación de factores de riesgo no modificables generarán una ansiedad innecesaria en pacientes y parientes asintomáticos. Pacientes con trombosis arterial no representan buenos candidatos para investigar defectos trombofílicos hereditarios.

El estudio de trombofilia debería enfocarse a aquellos pacientes en los cuales los hallazgos de laboratorio son con mayor probabilidad positivos o cambiarán conductas terapéuticas. Entre estos se incluye a pacientes jóvenes (menores de 45 años) con trombosis inexplicada, recurrente o en sitios inusuales, mujeres con mala historia obstétrica y potenciales usuarias de anticonceptivos orales con historia personal o familiar de trombosis. La investigación de laboratorio a parientes de primer grado de portadores de defectos trombofílicos es motivo de controversia y en caso de hacerlo debe ser acompañada de una cuidadosa explicación de los resultados y consejería especializada.

El estudio de laboratorio debe contemplar un panel mínimo de pruebas que incluyen los defectos de mayor prevalencia en la población y aquellos que aun siendo de baja frecuencia, se asocian a riesgo alto de trombosis (tabla 38-7).

Tabla 38-7. Panel mínimo de estudio de las trombofilias

• Antitrombina AT, ensayo funcional
• Proteína C, ensayo funcional
• Proteína S libre, ensayo antigénico
• Resistencia a la proteína C activada
• Factor V Leiden
• Mutación G20210A de la protrombina
• Anticuerpos antifosfolípidos (AL, Ac aCL)
• Homocisteína plasmática

AL, Anticoagulante lúpico, Ac aCL, Anticuerpos anticardiolipina

El momento en que se realiza el estudio de laboratorio también es una variable importante a considerar. Los episodios tromboembólicos agudos, con o sin tratamiento concomitante, pueden influir de modo importante en los resultados y dificultar su interpretación. Por esta razón se recomienda efectuar la investigación de laboratorio 6 meses después del episodio agudo. Debido a que el uso

de anticoagulantes orales afecta los valores de la PC, PS el estudio no se debiera realizar antes de dos semanas de suspendido el tratamiento.

6. LECTURAS SUGERIDAS

Trombofilias hereditarias

Anderson J.A., Hogg K.E., Weitz J.I., "Hypercoagulable states" In : **Hematology basic principles and practice**, Hoffman, R., Benz, E.J., Silberstein L.E., Heslop H.E., Weitz J.I., Anastasi J., Salama M.E., Abutalib S.A., 7nd Edition. Elsevier Philadelphia, 2018, pp. 2076-2087.

Bauer KA, Nguyen-Cao TM, Spears JB. Issues in the Diagnosis and Management of Hereditary Antithrombin Deficiency. Ann Pharmacother. 2016;50:758-67.

Campello E, Spiezia L, Adamo A, Simioni P. Thrombophilia, risk factors and prevention. Expert Rev Hematol. 2019; 12:147-158.

Dahlback B. Advances in understanding pathogenic mechanisms of thrombophilic disorders. Blood. 2008;112: 19-27.

Heit J.A. Epidemiology and risk factors for venous thromboembolism, En Hemostasis and Thrombosis, Basic principles and Clinical Practice, Marder VJ, Aird WC, Bennett JS, Shulman S, White GC. JB Lippincot Co. Philadelphia, 2013, pp. 973-976.

Mannucci PM, Franchini M. The real value of thrombophilia markers in identifying patients at high risk of venous thromboembolism. Expert Rev Hematol. 2014;7:757-65.

MacCallum P, Bowles L, Keeling D. Diagnosis and management of heritable thrombophilias. BMJ. 2014;349:4387.

Middeldorp S, Coppens M. Hereditary Thrombophilias. En: Williams Hematology, Kaushansky K, Prchal JT, Burns LJ, Lichtman MA, Levi M, Linch DC. MacGraw Hill, New York 2021, pp 2349-2360.

Montagnana M, Lippi G, Danese E. An Overview of Thrombophilia and Associated Laboratory Testing. Methods Mol Biol. 2017;1646:113-135.

Stevens SM, Woller SC, Bauer KA, Kasthuri R, Cushman M, Streiff M, Lim W, Douketis JD. Guidance for the evaluation and treatment of hereditary and acquired thrombophilia. J Thromb Thrombolysis. 2016;41:154-64.

Trombofilias adquiridas

Den Heijer M, Koster T, Blom HJ et al.: Hyperhomocysteinemia as a risk factor for deep vein thrombosis. N Engl J Med 1996; 334:759-762.

Falanga ASF, Russ L. Pathophysiology 1. Mechanisms of thrombosis in cancer patients. In: Soff G, ed. Thrombosis and Hemostasis in Cancer. Gewerbestrasse, Switzerland: Springer; 2019:11-36.

Garcia D, Erkan D. Diagnosis and Management of the Antiphospholipid Syndrome. N Engl J Med. 2018;378:2010-2021.

Giannakopoulos B, Krilis SA. The pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. N Engl J Med 2013;368:1033-44.

Horsted F,West J, Grainge MJ. Risk of venous thromboembolism in patients with cancer: a systematic review and meta-analysis. PLoS Med. 2012;9(7):e1001275.

Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). J Thromb Haemost 2006;4: 295-306.

Palomo, I., Cabral, A., Pierangeli, S., Forastiero, R. "Síndrome Antifosfolípido". En: **Inmunología Básica y Clínica,** Palomo, I., Ferreira, A., Sepúlveda, C., Rossemblatt, M., Vergara, U. (eds.), Cap. 25, Editorial Universidad de Talca, 2002.

Palomo, I., Pereira, J., Alarcón, M., Larrain, A.M., Vasquez, M., Leon, M., Espínola, R., Pierangeli, S. "Antiphospholipid antibodies in Chilean patients with systemic lupus erythematosus". *J Lab Clin Med*; 2002;140:336-41.

Palomo, I., Pereira, J., Alarcon, M., Vasquez, M., Pinochet, C., Velez, M.T., Sandoval, J., Icaza, G., Pierangeli, S. "Prevalence and isotype distribution of antiphospholipid antibodies in unselected Chilean patients with venous and arterial thrombosis". *Clin Rheumatol*. 2004;23:129-33.

Pengo V, Ruffatti A, Legnani C, et al. Clinical course of high-risk patients diagnosed with antiphospholipid syndrome. J Thromb Haemost 2010;8:237-42.

Pengo V, Tripodi A, Reber G, et al. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. J Thromb Haemost 2009;7:1737-40.

Sacharidou A, Shaul PW, Mineo C. New Insights in the Pathophysiology of Antiphospholipid Syndrome. Semin Thromb Hemost. 2018;44:475-482.

Schreiber K, Sciascia S, de Groot PG, Devreese K, Jacobsen S, Ruiz-Irastorza G, Salmon JE, Shoenfeld Y, Shovman O, Hunt BJ. Antiphospholipid syndrome. Nat Rev Dis Primers. 2018; 11;4:17103.

Timp JF, Braekkan SK, Versteeg HH, Cannegieter SC. Epidemiology of cancer associated venous thrombosis. Blood 2013;122:1712–1723.

Trombofilia mixta

Green, R. "Homocysteine Today: The Folate-Cobalamin connection. ASH Education Program Book". *Hematology*; 69 – 73, 2003.

Franchini M, Martinelli I, Mannucci PM. Uncertain thrombophilia markers. Thromb Haemost. 2016;115:25-30.

Rosendaal FR. High levels of factor VIII and venous thrombosis. Thromb Haemost 2000; 83: 1–2.

Simone B, et al. Risk of venous thromboembolism associated with single and combined effects of Factor V Leiden, Prothrombin 20210A and Methylenetethraydrofolate reductase C677T: a meta-analysis involving over 11,000 cases and 21,000 controls. Eur J Epidemiol 2013; 28: 621–647.

TALCA
UNIVERSIDAD
CHILE

Facultad Ciencias de la Salud

Departamentos

Depto. Salud Pública
Depto. Bioquímica Clínica e Inmuhonematología
Depto. Microbiología
Depto. Ciencias Básicas Biomédicas
Depto. de Ciencias del Movimiento Humano
Depto. de Ciencias de la Fonoaudiología

Programas de postgrado

Doctorado en Ciencias Biomédicas
Magíster en Ciencias Biomédicas
Menciones:
Bioquímica Clínica e Inmunohematología
Microbiología Médica
Patología Oral

Escuelas

Escuela de Tecnología Médica
Escuela de Kinesiología
Escuela de Fonoaudiología
Escuela de Enfermería
Escuela de Nutrición y Dietética
Escuela de Obstetricia

CS Facultad Ciencias de la Salud
Universidad de Talca

lct

LABORATORIO CLÍNICO TALCA

1980 a la fecha

- Hematología
- Química Clínica
- Hormonas
- Inmunología
- Microbiología
- Parasitología

Control de calidad interno y externo

Diagonal 99, Talca
www.laboratoriotalca.cl

TALCA
UNIVERSIDAD
CHILE

Este libro, **Hematología: Fisiología y Fisiopatología** (2022), es una reedición actualizada del libro **Hematología: Fisiopatología y Diagnóstico** (2005).

El libro está estructurado en dos apartados, Fisiología y Fisiopatología. Cada apartado cuenta con cuatro secciones: Hematopoyesis, Serie roja, Serie blanca y Hemostasia. En total, 38 capítulos.

Los capítulos fueron preparados por médicos/as hematólogos/as, tecnólogos/as médicos/as y otros/as profesionales especializados en hematología, tanto nacionales como extranjeros.

Hematología: Fisiología y Fisiopatología se preparó pensando especialmente en los/as estudiantes de pregrado de las diferentes carreras de la Salud que en su plan de estudios incluyen Hematología.

El hecho de que el libro sea digital y con figuras a color, y sea parte de la colección E-Book de la Editorial de la Universidad de Talca con acceso libre, esperamos lo torne atractivo para los/as estudiantes.